

# DIE ROLLE DES ENDOGENEN STICKSTOFFMONOXIDS FÜR DEN PULMONALEN ISCHÄMIE-/ REPERFUSIONSSCHADEN IM MODELL DER ISOLIERTEN KANINCHENLUNGE

**HEIKO BURGER**



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Die Rolle des endogenen Stickstoffmonoxids für  
den pulmonalen Ischämie-/ Reperfusionsschaden  
im Modell der isolierten Kaninchenlunge**

**INAUGURALDISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von**

**Heiko Burger**  
aus Berlin

**Gießen 2007**

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger**

**Gutachter: Prof. Dr. Werner Seeger**

**Gutachter: PD Dr. Rosengarten**

**Tag der Disputation: 20.08.2008**

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Fragestellung.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Vorwort.....	1
1.2.	Einführung: Auftreten und Folgen von Ischämie- und Re- perfusionseignissen im menschlichen Organismus.....	1
1.3.	Pulmonale Gefäßregulation, Pathophysiologie des pulmonalen Ischämie- und Reperfusionsschadens und Übersicht zum Stand der Forschung.....	5
1.3.1.	Rolle der neutrophilen Granulozyten.....	7
1.3.2.	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	8
1.3.3.	Einfluss des Komplementsystems.....	10
1.3.4.	Einfluss von Lipidmediatoren.....	11
1.3.5.	Die alveolo-epitheliale Barrierefunktion.....	13
1.3.6.	Rolle des Mediators Stickstoffmonoxid.....	14
1.3.7.	Biophysikalische Parameter.....	21
1.4.	Zielsetzung der vorgestellten Dissertationsarbeit.....	22
<b>2.</b>	<b>Material.....</b>	<b>24</b>
2.1.	Chemikalien und Geräte für das Modell der isolierten Kaninchenlunge.....	24
2.1.1.	Gase, experimentelle Agenzien und Pharmaka.....	24
2.1.2.	Geräte und Hilfsmittel.....	24
2.2.	Material und Geräte für die Chemilumineszenzmessung.....	26
2.2.1.	Verwandte Gase und Agenzien.....	26
2.2.2.	Geräte und Hilfsmittel.....	26
<b>3.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.1.	Modell der isolierten Kaninchenlunge (ILU).....	28
3.1.1.	Einführung.....	28
3.1.2.	Versuchsaufbau.....	28

3.1.3. Präparation der isolierten Kaninchenlunge.....	33
3.1.4. Pflege und Wartung der Perfusionssysteme.....	35
<b>3.2. Messparameter.....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Druck- und Gewichtsregistrierung.....	36
3.2.2. „Double-Clamping“-/ „Double Occlusion“-Technik zur Erfassung der mikrovaskulären Druckwerte.....	37
3.2.3. Ermittlung des kapillären Filtrationskoeffizienten (K <sub>fc</sub> ), der vaskulären Compliance und der Retention.....	38
<b>3.3. NO<sub>x</sub>-Analytik.....</b>	<b>40</b>
3.3.1. Messprinzip der Chemilumineszenz.....	40
3.3.2. Aufbau des Chemilumineszenzdetektors UPK 3100.....	41
3.3.3. Wartung und Pflege der Chemilumineszenzdetektoren.....	43
3.3.4. Integration der NO-Analytik zur Konzentrationsbestim- mung im exhalativen Atemgas.....	43
3.3.5. Messprinzip zur Erfassung der im Perfusat gelösten oxidativen Endprodukte (NO <sub>x</sub> ) mit Hilfe der Vanadium (III)Chlorid-Reaktionskammer.....	44
3.3.6. Integration der NO <sub>x</sub> -Analytik zur Erfassung der oxidat- iven Endprodukte (NO <sub>x</sub> ) im Perfusat und Aufbau der Vanadium (III) Chlorid-Reaktionskammer.....	45
3.3.7. Kalibration der Vanadium(III)Chlorid-Reaktionskammer.....	47
<b>3.4. Fehlerkorrektur der NO<sub>x</sub>-Analyse unter Verwendung von hydroxyethylstärkehaltigem (HAES) Perfusat am Model der isolierten Kaninchenlunge.....</b>	<b>49</b>
3.4.1. Problembeschreibung und Begründung zur Einführung einer Fehlerkorrektur.....	49
3.4.2. Mathematische Herleitung des verwandten Algorithmus.....	50
3.4.3. Validitätskontrolle der erstellten Fehlerkorrektur.....	54
<b>3.5. Experimentelles Protokoll.....</b>	<b>56</b>
<b>3.6. Statistik.....</b>	<b>59</b>

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ergebnisse der Versuchsreihen mit 180- und 210-minütiger Ischämieperiode unter den Bedingungen der vasalen Distension.....</b>	<b>61</b>
4.1.1.	Ergebnisse der Stickstoffmonoxid (NO)-Analyse im exhalativen Atemgas vor, während und nach der Ischämieperiode.....	61
4.1.2.	Messergebnisse der intravasalen NO <sub>x</sub> -Analyse vor und nach der Ischämieperiode.....	65
4.1.3.	Messergebnisse der intravasalen NO <sub>x</sub> -Analyse im Ischämieintervall als Kumulativ-Befund.....	69
4.1.4.	Verlauf des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP).....	72
4.1.5.	Ergebnisse der prä- und postischämischen Messung des kapillären Filtrationskoeffizienten (K <sub>fc</sub> ), der Gewichtsretention und der Gefäßcompliance.....	76
4.1.6.	Entwicklung des mikrovaskulären Drucks.....	83
<b>4.2.</b>	<b>Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 90-minütige Ischämie unter anoxischer Ventilation mit kollabierten Gefäßen .....</b>	<b>85</b>
4.2.1.	Ergebnisse der Stickstoffmonoxid (NO)-Analyse im exhalativen Atemgas vor, während und nach der Ischämieperiode.....	85
4.2.2.	Messergebnisse der intravasalen NO <sub>x</sub> -Analyse vor und nach der Ischämieperiode.....	87
4.2.3.	Verlauf des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP), des mikrovaskulären Drucks, des kapillären Filtrationskoeffizienten (K <sub>fc</sub> ), der Gewichtsretention sowie der Gefäßcompliance.....	89
<b>5.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>92</b>
5.1.	Einfluss von warmer Ischämie und konsekutiver Reperfusion auf die Integrität der isolierten Kaninchenlunge.....	92
5.2.	Einfluss von Ischämie-/ Reperfusion auf die NO-Liberation unter vasaler Distension in der Ischämiephase.....	93



5.3.	Einfluss eines während der Ischämie bestehenden vasalen Kollaps auf die NO-Liberation.....	95
5.4.	Zusammenhang zwischen der NO-Liberation und dem Ischämie-/ Reperfusionsschaden.....	96
5.5.	Mögliche Beziehungen zwischen der Anwesenheit von Sauerstoff, der NO-Liberation und der Generation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Genese des Ischämie-/ Reperfusionsschadens.....	100
5.6.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	102
 <b>6. Zusammenfassung.....</b>		<b>106</b>
 <b>7. Summary.....</b>		<b>108</b>

## Anhang

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Literaturverzeichnis.....	XI
Publikationsverzeichnis.....	XXV
Lebenslauf.....	XXVI
Erklärung zur Dissertationsarbeit.....	XXVIII
Danksagung.....	XXIX

**Abkürzungsverzeichnis:**

Abb.	Abbildung
AD	analog-digital
APSAC	Acylierter Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex
ARDS	adult respiratory distress syndrom
ATP	Adenosin-Triphosphat
bzw.	beziehungsweise
C	Kondensatorkapazität
°C	Grad Celsius
©	Copyright
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzenimeter
cm H <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
cNOS	konstitutive NO-Synthase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Δ	Delta
DA	digital-analog
DNS	Desoxyribonukleinsäure
e <sup>-</sup>	Elementarladung
ecNOS	endothelial konstitutive NO-Synthase
EDRF	endothelium-derived-relaxing-factor
FiO <sub>2</sub>	inspiratorischer Sauerstoffanteil
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Gl.	Gleichung
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
H <sup>+</sup>	Hydronium-Ion
HAES	Hydroxyethylstärke
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogenkarbonat
Hg	Quecksilber

H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hz	Hertz
I.E.	internationale Einheiten
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRDS	infant respiratory distress syndrom
Kap.	Kapitel
K <sub>fc</sub>	kapillärer Filtrationskoeffizient
kg	Kilogramm
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
KHKB	Krebs-Henseleit-Hydroxyethylstärke-Puffer
KHK	koronare Herzerkrankung
L-NA	L-Nitro-Arginin
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin Methylester
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
LVP	linksventrikulärer Druck
M	Molar
μ	micro (10 <sup>-6</sup> )
μM	micromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl gleicher Experimente
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
ncNOS	neurale konstitutive NO-Synthase
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit-Ion
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat-Ion
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NO <sub>x</sub>	NO-Abbauprodukte (Peroxynitrit, Nitrit und Nitrat)

---

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
O <sub>3</sub>	Ozon
o.g.	oben genannt
OH <sup>-</sup>	Hydroxylradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit-Anion
P	Druck
Pa	pulmonalarterieller Druck
PA	pulmonalarteriell
PAP	pulmonalarterieller Druck
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
P <sub>c</sub>	Kapillardruck
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PMN	monozytäres Phagozytensystem
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
ppt	parts per trillion
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
Pv	pulmonalvenöser Druck
Q	Perfusionsfluß
R	Regressionsgerade
R	Widerstand
RES	retikuloendotheliales System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
r-PA	rekombinanter Plasminogen-Aktivator
s	Sekunde
sec	Sekunde
S.E.M.	standard error of the mean
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-penisillamine
s.o.	siehe oben
SOD	Superoxid Dismutase

---

sCR1	soluble complement receptor type 1
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TEA	Thrombendarteriektomie
TM	Trademark
t-PA	tissue-type Plasminogen-Aktivator
U	Units
u.a.	unter anderem
$\dot{V}$	Volumenfluß
V	Vanadium
V(III)/VCl <sub>3</sub>	Vanadium(III)Chlorid
vgl.	vergleiche
VP	Beatmungsdruck
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

## 1. Einleitung und Fragestellung

### 1.1. Vorwort

Die Untersuchungsergebnisse der vorgestellten Dissertationsarbeit basieren auf der experimentellen Datenerhebung im Zeitraum September 1996 bis Februar 1998 im klinischen Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger.

Ziel dieser Untersuchungen war es, pathophysiologische Grundlagen im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionsmodells an der isolierten Kaninchenlunge zu erforschen. Im Speziellen wurde nach einem Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid und der Schwere des postischämischen Gewebsschadens gesucht. So sollten mögliche Ansätze für neue Strategien der Organpräservierung im Rahmen der Lungentransplantation aufgezeigt werden. Die gewonnenen Daten waren Grundlage der Publikation „Endogenous Nitric Oxide Synthesis And Vascular Leakage In Ischemic-Reperfused Rabbit Lungs“, die 2001 im *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164, Seiten 412-418 veröffentlicht wurden.

### 1.2. Einführung: Auftreten und Folgen von Ischämie- und Reperfusionsereignissen im menschlichen Organismus

Kommt es im menschlichen Körper zu einer unzureichenden Durchblutung von Organen, so stellt dies, abhängig von der Lokalisation im Organismus, eine deutliche Beeinträchtigung der körperlichen Integrität dar. Diesen Zustand bezeichnet man als Ischämie. In der Folge wird das abhängige Gewebe nur unzureichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Weiterhin bedingt die gestörte Perfusion einen unzureichenden Abtransport und damit Kumulation der anfallenden Stoffwechsel-Endprodukte. Kommt es z.B. nach einer PTCA zur Wiedereröffnung des Gefäßverschlusses und damit zur Reperfusion, werden diese Valenzen ausgeschwemmt. Ein Ischämieereignis kann die Ursache schwerwiegender Funktionsstörungen im Rahmen von kardio-, zerebro- und pulmonal-vaskulären Erkrankungen sein.

Grundsätzlich gilt es, zwischen einer *relativen* und einer *absoluten* Ischämie zu unterscheiden. Die vorgestellte Dissertationsarbeit beschäftigt sich zwar mit den Phänomenen der absoluten Ischämie, zur Vollständigkeit sei aber auch kurz die relative Ischämie skizziert:

Eine *relative* Ischämie entsteht zumeist auf Grundlage einer sich langsam entwickelnden, progredienten Arteriosklerose. Die Einengung der arteriellen Gefäße führt hierbei zu Stenosen. Beschwerden werden hierbei typischerweise zunächst unter körperlicher Belastung beklagt, wenn die Stenose den Blutfluss so stark kompromittiert, dass der tatsächlich benötigte Blutfluss die Einengung nicht mehr passieren kann. Typische Krankheitsbilder in diesem Zusammenhang sind die koronare Herzerkrankung (KHK), die zerebrovaskuläre Insuffizienz oder die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).

Im Gegensatz hierzu stellt die *absolute* Ischämie ein zumeist akutes, oft lebensbedrohliches Ereignis mit dem kompletten Verschluss eines oder mehrerer arterieller Gefäße dar. Grundlegend kommen hier drei pathologische Mechanismen zum Tragen:

- 1.) Ein venöses embolisches Ereignis: Das Ausschwemmen eines Thrombus aus einer tiefen Bein- oder Beckenvene kann z.B. zur Lungenembolie führen.
- 2.) Eine arterielle Thrombembolie: Im Rahmen von Herzrhythmusstörungen, wie z.B. beim Vorhofflimmern kann ein Vorhofthrombus entstehen, der mit dem Blutfluss ausgeschwemmt wird und peripher ein arterielles Gefäß verlegt. Die Folge kann z.B. ein zerebraler Schlaganfall sein.
- 3.) Auf der Grundlage einer Gefäßwandläsion (z.B. eines arteriosklerotischen Plaques) kann es zur Thrombozytenauflagerung kommen. Das plasmatische Gerinnungssystem wird aktiviert, die initialen Blutplättchen werden mit Fibrin überdeckt. Vorbeischwimmende Erythro- und Leukozyten heften sich an und der Kreislauf beginnt von vorne. Letztlich endet dieser Kreislauf im kompletten Gefäßverschluss durch einen gemischten Abscheidungsthrombus (VIRCHOW-Trias).

In der Folge einer unterbrochenen Durchblutung kommt es zur Gewebshypoxie mit Reduktion der oxidativen Phosphorylierung, zur Einleitung der anaeroben Glykolyse, dem darin begründeten Versagen einer ausreichenden Resynthese des energierei-

chen Adenosin-Triphosphats (ATP), zur Störung der Ionen-Pumpen und Transportfunktionen für Glucose und Laktat, zum Auftreten von freien Radikalen, zur mitochondrialen Dysfunktion, zur Freisetzung von immunologischen Faktoren und inflammatorischen Zytokinen; und letztlich resultiert eine acidotische Stoffwechsellage im betroffenen Gewebe. Auf diese Weise entstehen Endothelzellläsionen an der Gefäßwand, die zur Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität führen. Konsekutiv kommt es zur Flüssigkeitsverschiebung in das paravasale Kompartement - zur Ödembildung.

Nach Ablauf einer organspezifischen Ischämietoleranz stellen sich irreversible Gewebeschäden ein. Durch Einleitung von Apoptose und Nekrose kommt es zum nachfolgenden Zelluntergang. Abhängig vom Umfang und der Bedeutung des Gewebsverlustes für die Organfunktion gestaltet sich der weitere Verlauf. So kann beispielsweise ein proximaler Verschluss eines Herzkranzgefäßes zum ventrikulärem Pumpversagen führen oder eine fulminante Lungenembolie eine massive respiratorische Insuffizienz bedingen. In diesen Fällen ist oftmals ein letaler Ausgang unabwendbar. Ist der eingetretene Funktionsverlust jedoch kompensierbar, so folgt in Abhängigkeit vom Versorgungstyp des Organs (arterielle Doppelversorgung z.B. vasa privata und publica oder kaskadenartige Blutversorgung) die Ausbildung einer Koagulations- oder Kolliquationsnekrose, die anschließende Organisation dieser, die Ausbildung von Granulationsgewebe und letztlich resultiert Narbengewebe mit dem Verlust der organspezifischen Eigenschaften (RIEDLE/SCHAEFER [1]).

Zur Abwendung einer vitalen Bedrohung und zur Reduktion des zu erwartenden Gewebsschadens wird im Fall eines akuten Gefäßverschlusses die schnellstmögliche Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes angestrebt. Hierzu kommen die pharmakologische Lyse-Therapie (mit Strepto-/Urokinase, APSAC, t-PA oder r-PA), die interventionelle Gefäßdilataion (z.B. die PTA), die operative Embolektomie bzw. Thrombendarteriektomien (TEA) oder die Bypassoperation in Betracht. Nach gelungener Wiedereröffnung eines Gefäßverschlusses kommt es zur Reperfusion des Gewebes. In Abhängigkeit von der Ischämiezeit werden mit erneuter Perfusion saure Valenzen, Stoffwechselendprodukte, autolytische Komponenten, intrazelluläre Enzyme und Zelldetritus mit dem Blutkreislauf in den Organismus geschwemmt. Dies kann zu systemischen Reaktionen wie Arrhythmien oder Entzündungsreaktionen führen.



Von besonderem Interesse sind die pathophysiologischen Grundlagen von Ischämie und Reperfusion im Zusammenhang mit Organtransplantationen zu sehen. Hierbei bedingt die Organentnahme eine unvermeidbare absolute Ischämie und nach der Reimplantation kommt es mit der Freigabe des Blutflusses zur Reperfusion.

Gerade durch die verbesserten Möglichkeiten der pharmakologischen Immunsuppression z.B. durch Dreifach-Kombinationen von Glukokortikoiden mit Azathioprin (Imurek®) bzw. Mycophenolatmofetil (Cellcept®) und Cyclosporin (Sandimmun®) oder Tacrolimus (Prograf®) [2] stellt die Organtransplantation heutzutage eine tragfähige therapeutische Alternative dar und ist mit einer akzeptablen Lebensqualität für den Patienten verbunden.

Leider sind aufgrund eines relativen Organmangels und der begrenzten Organspenden allein in Deutschland etwa 12.000 Patienten auf Transplantationswartelisten vermerkt. Etwa 9.000 Patienten warten allein auf eine Nierentransplantation. Insgesamt konnten im vergangenen Jahre 253 Lungentransplantationen in Deutschland durchgeführt werden, während allerdings 396 Patienten neu zur Transplantation angemeldet wurden. (Die Daten beziehen sich auf das Jahr 2006 und entstammen der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO)). Rund ein Drittel dieser Patienten verstirbt noch vor einer möglichen Transplantation [3]. Umso entscheidender ist es daher, eine optimale Organpräservierung für die unvermeidbare Ischämiezeit während des Transports zu finden und ein Spenderorganversagen (primary graft failure) nach Implantation zu vermeiden. Ein solches Organversagen nimmt bei Lungen- und Herzverpflanzungen trotz intensivmedizinischer Bemühungen häufig einen letalen Ausgang. ZENATI et al. [4] beschrieben einige Beispiele von drohendem schweren Lungenorganversagen unmittelbar nach der Transplantation (primary severe donor lung dysfunction). Mit Hilfe eines zeitlich befristeten Einsatzes eines extrakorporalen Membranoxygenators konnte er in einigen Fällen ein Transplantatversagen und somit den Tod des Patienten abwenden. CHRISTIE et al. [5] betrachteten retrospektiv 100 lungentransplantierte Patienten. Hierbei kam es in 15% der Fälle zum primären Transplantatversagen. Eine hyperakute Abstoßungsreaktion konnte nach histologischer Aufarbeitung ebenso wenig für diese Reaktion verantwortlich gemacht werden wie andere prädisponierende Faktoren (z.B. eine verlängerte Ischämieperiode, ein HLA-mismatch oder Vorerkrankungen der Patienten). Letztlich vermutete man einen Ischämie-/ Reperfusionsschaden und der Ruf nach verbesserten Techniken zur Organpräservierung wurde laut. Hiernach suchte PINSKY [6] in tierexperimentellen Herz-

und Lungentransplantationen an Ratten. Er konnte aufzeigen, dass sich durch eine Erhöhung der Aktivität von cAMP und NO / cGMP sowie durch Unterdrückung der Interaktion zwischen Neutrophilen und den Endothelzellen die Haltbarkeit der Organe steigern ließ.

In diesem Themenbereich ist die vorgestellte Dissertationsarbeit einzusortieren. Es ist von entscheidender Bedeutung, die komplexe Pathophysiologie des Ischämie- und Reperfusionssyndroms genauer zu untersuchen und zu verstehen. Nur so ergeben sich kausale Ansätze auf der Suche nach neuen Interventionsstrategien.

Die vorliegende Dissertationsarbeit beschäftigt sich daher mit einem bislang ungeklärten Aspekt des pulmonalen Ischämie-/ Reperfusionssyndroms – der Rolle des endogenen Stickstoffmonoxids für den pulmonalen Ischämie-/ Reperfusionsschaden im Modell der isolierten Kaninchenlunge.

### **1.3. Pulmonale Gefäßregulation, Pathophysiologie des pulmonalen Ischämie- und Reperfusionsschadens und Übersicht zum Stand der Forschung**

Das einschichtige Gefäßendothel spielt im Rahmen der pulmonalen Gefäßregulation eine bedeutende Rolle. Zum einen bildet es die anatomische Grenze zwischen dem zirkulierenden Blut und der Gefäßwand, zum anderen ist es in der Lage, Mediatoren zu synthetisieren, die Gefäßtonus und -wachstum regulieren und die Thrombozytenaggregation beeinflussen. So bewirken z.B. Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ ) und Stickstoffmonoxid (NO) eine Vasodilatation und hemmen die Thrombozytenaggregation. Endothelin verursacht im Gegensatz hierzu eine Vasokonstriktion. Auf diese Weise wird das Gefäßkaliber dem benötigten Blutfluss angepasst (siehe Kap.1.3.4. und 1.3.6.).

Endogenes NO wird von den Endothelzellen aus der Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin durch NO-Synthasen synthetisiert (PALMER et al. [7], SAKUMA et al. [8]). Ausgelöst durch die mechanische Scher- bzw. Schubspannung des vorbeiströmenden Blutes oder rezeptorvermittelt z.B. durch Acetylcholin, Serotonin und Histamin kommt es zur Stimulation der NO-Synthasen und anschließend zur Liberation des gasförmigen NOs.

Endothelzellläsionen bedingen einen lokalen NO-Mangel. Es kommt zur Wirkungs-umkehr von Acetylcholin, Serotonin und Histamin mit nun vasokonstriktiver und aggregationsfördernder Wirkung. Ebenso kann es unter pathologischen Bedingungen wie z.B. im Rahmen einer bakteriellen Sepsis zu einer veränderten NO-Synthese kommen (BACHETTI et al. [155]).

Besonders sensibel stellt sich die pulmonale Zirkulation gegenüber Ischämie-/ Re-perfusionsereignissen dar, wie sie z.B. bei der akuten Lungenembolie oder im Rahmen von Lungentransplantationen auftreten können. Bereits nach kurzer Ischämie-zeit kommt es zur Störung der Mikrozirkulation. Die Folgen werden allerdings erst nach erfolgter Reperfusion offenkundig: Eine ausgeprägte prä- und postkapilläre Vasokonstriktion ist zu Beginn der Reperfusionsphase zu beobachten, woraus ein hä-modynamisch relevanter pulmonaler Hypertonus resultiert, wie dies GILROY et al. [12] mit Hilfe von in vivo-Versuchen an Schaflungen demonstrierten konnten. So vermuteten ALLISON et al. bereits 1990 [13], dass es durch eine Widerstandserhöhung im Bereich der postkapillären Venolen zu einer Erhöhung des Filtrationsdruckes im Kapillarbett mit konsekutiver Ödembildung kommen könnte. Die auftretende Flüssig-keitsextravasation ist allerdings nicht nur als Folge eines erhöhten Filtrationsdruckes zu verstehen, sondern vor allem auch Ausdruck einer ausgeprägten Störung der ka-pillar-endothelialen Schrankenfunktion (siehe Kap. 1.3.5.). BISHOP et al. [14] vermuteten, dass diese Schädigung bereits während der Ischämieperiode, also noch vor der Reperfusion entsteht. ROSE et al. [15] zeigten in diesem Zusammenhang eine Schädigung der alveolo-epithelialen Barriere durch reaktive Sauerstoffmetabolite (ROS, siehe Kap. 1.3.2.) auf und konnten einen protektiven NO-Effekt unter oxidati-vem Stress erkennen. In welchem Umfang Ischämie und Reperfusion darüber hinaus eine gesteigerte Permeabilität der alveolo-epithelialen Schrankenfunktion induziert, ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. Sicher erscheint, dass die Integrität dieser Schrankenfunktion für die Regulation des pulmonalen Flüssigkeitshaushalts von wesentlicher Bedeutung ist (siehe Kap.1.3.5.).

Die oben aufgeführten Veränderungen können zu einer hochgradigen Beeinträchti-gung des Gasaustausches und einer Störung der Ventilations-Perfusions-Verteilung mit Zunahme des Shuntflusses führen (HERMLE et al. [16]). Klinisch kann sich so das Vollbild des ARDS entwickeln.

Wesentliche Faktoren, die nach heutigem Kenntnisstand in einen pathogenetischen Zusammenhang mit dieser Form des Lungenversagens gebracht werden, sind Gegenstand der derzeitigen Forschung und werden im Folgenden kurz zusammengefasst:

### **1.3.1. Rolle der neutrophilen Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten (PMN) spielen in Organen wie Herz, Leber, Darm und Niere in vivo eine wichtige Rolle bei der Genese des Reperfusionsschadens. Insbesondere während der Ischämiephase kommt es zur Expression von Adhäsionsfaktoren auf der endothelialen Oberfläche der betroffenen Gefäße. Nach Reperfusion resultiert daraus eine verstärkte Interaktion zwischen den zirkulierenden Granulozyten und dem mikrovaskulären Endothel.

Da die Lunge eine große Kontaktfläche zur Außenwelt aufweist, wird sie mit einer Vielzahl körperfremder Noxen konfrontiert. Daher besitzt sie einen ausgedehnten Marginalpool an neutrophilen Granulozyten und somit schon während einer Ischämiephase ein ausgeprägtes pro-inflammatorisches Potenzial. Untersuchungen von SEIBERT et al. [17] an isolierten Rattenlungen deuteten bereits auf eine wichtige Rolle dieses stationären Zellkollektivs für das pulmonale Ischämie-/ Reperfusionssyndrom hin. In der Reperusionsphase scheint es zu einer weiteren Expansion des mikrovaskulären Sequestrationspools durch zirkulierende Granulozyten zu kommen. Vermutlich bestehen funktionelle Unterschiede zwischen dem prä-existenten Granulozytenpool und dem in der Reperusionsphase rekrutierten Expansionspool. Die pulmonal sequestrierten Granulozyten können durch lokalisierte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), proteolytischen Enzymen, Zytokinen und Lipidmediatoren unmittelbar zytotoxische, aber auch systemische Effekte mit sekundärer Aktivierung pro-inflammatorischer Zellen entfalten. Untersuchungen an verschiedenen in vitro Reperusionsmodellen haben gezeigt, dass sich die mikrovaskuläre Rekrutierung von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten durch die Blockade der Adhäsionsmoleküle mit Hilfe von spezifischen Antikörpern unterdrücken lässt. So konnten MOORE et al. [18] eine Verminderung des pulmonalen Reperfusionsschadens erreichen.

Um die oben beschriebenen Interaktionen durch zirkulierende zelluläre Blutbestandteile zu vermeiden, wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit ein blutfrei perfundiertes isoliertes Organmodell verwandt.

### 1.3.2. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies subsummiert man Superoxid ( $O_2^-$ ), Wasserstoff-Peroxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxyl-Radikale ( $OH^\cdot$ ) und Peroxinitrit ( $ONOO^-$ ). Unter physiologischen Bedingungen werden sie u.a. im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen nach Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (PMN) und Makrophagen während der eingeleiteten Phagozytose freigesetzt.

Allerdings kommt es nicht nur im Rahmen der Phagozytose zum Auftreten von ROS. Auch unter den Bedingungen des Ischämie-/ Reperfusionssyndroms wurde ihr Erscheinen beschrieben. So wird in vielen Organen ihrer Anwesenheit eine zentrale Bedeutung bei der Genese von Zellschäden unter anoxischen Bedingungen zugesprochen. Ebenso geht man davon aus, dass sie im Zusammenhang mit dem pulmonalen Ischämie-/ Reperfusionssyndrom eine wichtige Rolle in der Entstehung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens einnehmen (HAMMOND et al. [19], BULKLEY [20], GRISHAM et al. [21], BOSTEK [22], ANTONACI et al. [23]).

Grundsätzlich besteht Übereinstimmung darin, dass die unten benannten Enzymsysteme in der Lage sind, ROS zu synthetisieren. Ungeklärt ist allerdings, welche Bedeutung den einzelnen Enzymsystemen in diesem Zusammenhang zuzuordnen ist:

- a) Unter hyperoxischen Bedingungen der Lunge ist die Cytochrom p450-Oxidase in der Lage, Superoxid-Anionen zu generieren. Inwieweit und in welchem Umfang dieses Enzym unter pulmonalen Ischämie-/ Reperusionsbedingungen Superoxid produziert, ist nach derzeitigem Forschungsstand nicht geklärt.
- b) Unter anoxischen Bedingungen und gleichzeitigem ATP-Mangel, wie es bei pulmonaler Ischämie und Reperfusion der Fall ist, entstehen durch die Xanthin-Oxidase bei der Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin sowie der Folgereaktion zur Harnsäure (Urat) freie Sauerstoffradikale (BOSTEK [22], ZHAO et al. [24]).

- c) Eine besondere Bedeutung kommt der in Leukozyten und in pulmonalvaskulären Endothelzellen lokalisierten NADPH-Oxidase zu. AL-MEHDI et al. [25] zeigten, dass die endotheliale NADPH-Oxidase auch unter den Bedingungen einer normoxischen Ischämie ROS generieren kann. Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit von NO, die Entstehung der NADPH-Oxidase in Leukozyten zu hemmen (FUJII et al. [26]). Weiterhin können NO-induzierte Nitrosothiole eine Translokationshemmung von Untereinheiten der NADPH-Oxidase bewirken. Inwieweit man daher NO einen protektiven Effekt im Rahmen der Generierung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens zusprechen muss, ist unklar.
- d) Weiterhin ist neben der NO-Produktion eine Superoxid-Anionen Bildung durch die endotheliale NO-Synthase möglich. VÁSQUEZ-VIVAR et al. [27] konnten zeigen, dass die balancierte Produktion beider Radikale offenbar vom Kofaktor Tetrahydrobiopterin abhängig ist, der eine Kopplung zwischen NADPH-Verbrauch und L-Arginin-Oxidation bewirkt. Auf diesem Wege synthetisiertes NO kann durch den NO-Synthase Inhibitor N-Nitro-L-Arginin (L-NAME), wohl aber nicht durch N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) gehemmt werden. Die Bedeutung dieses Mechanismus im Rahmen der Ischämie-/ Reperfusion ist unklar.
- e) Ebenfalls ist die mitochondriale Atmungskette dazu in der Lage, ROS unter Hypoxie-Bedingungen zu bilden. Hierbei entsteht bei der Reduktion von Sauerstoff ( $O_2$ ) Superoxid ( $O_2^-$ ) anstelle von Wasser ( $H_2O$ ) (CHANDEL et al. [28]).

Uneinigkeit besteht ebenfalls in der Frage, zu welchem Zeitpunkt die ROS gebildet werden. Vorstellbar ist zum einen die Generation noch während der Ischämie unter hypoxischen oder anoxischen Bedingungen, zum anderen wäre die Entstehung nach hyp-/ anoxischer Ischämie unter normoxischen Bedingungen zum Zeitpunkt der Reperfusion denkbar.

Ebenso wurden mögliche Schädigungsmechanismen von einigen Arbeitsgruppen näher untersucht. Leider liegen bisher nur wenige Ergebnisse aus neueren Arbeiten vor. Der genaue Mechanismus, wie die vom Sauerstoff abstammenden Radikale und ihre Metabolite die Zelle und ihre Barriere schädigen, ist somit noch nicht eindeutig geklärt. Vermutlich können die ROS die Zelllyse, die Lipidperoxidation, die Aktivie-

rung der Guanylatzyklase und die Inhibition und Abkopplung zellulärer Membranenzyme bewirken. Besonders das Hydroxyl-Radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ) weist eine intensive Reaktivität und Zytotoxizität auf, so HEFFNER et al. [29]. Wasserstoff-Peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) bewirkt an den Alveolarepithelzellen in subletaler Konzentration eine Verminderung der Surfactant-Phosphatidylcholin-Biosynthese und führt zur Hydrolyse von Phosphatidylcholin.  $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirkt auch eine intrazelluläre Reduktion von Adenosintriphosphat (ATP) und führt in hohen Konzentrationen zur Zellyse (RICE et al. [30], CRIM et al. [31], RHEE [32]). Ebenfalls beschrieb MEEHAN et al. [33] das Auftreten von DNS-Schäden unter dem Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Weiterhin besitzen die Alveolarepithelzellen der Lunge antioxidative Schutzmechanismen. Deren Aufgabe es ist, die Formation freier Radikale zu verhindern, Oxidantien in weniger toxische Produkte zu konvertieren, reaktive Produkte zu kompartimentieren und so von vitalen Zellstrukturen fernzuhalten sowie molekulare Schäden zu reparieren. Hierzu dienen u.a. das vorwiegend in Peroxysomen vorkommende Katalase-System, das vorwiegend im Zytosol lokalisierte Glutathion-Redoxsystem und das Superoxid-Dismutase-System. Die drei Enzymsysteme müssen als komplementär angesehen werden und schützen sich auch gegenseitig vor einer Inaktivierung durch ROS. So kann z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  die SOD,  $\text{O}_2^\cdot$  die Funktion der Katalase und Peroxidase blockieren (HEFFNER et al. [29], FANTONE et al. [34], KIM et al. [35]).

Inwieweit durch Ischämie-/ Reperfusionssphänomene ein fein ausbalanciertes Gleichgewicht der einzelnen reaktiven Sauerstoffspezies ins Wanken gerät und/oder ein Versagen der zellulären Schutzmechanismen einen Einfluss auf den Ischämie-/ Reperfusionsschaden hat, ist bisher nicht geklärt. Möglich erscheint, dass ein geschädigtes Schutzsystem die Wirkung auftretender ROS verstärkt.

### 1.3.3. Einfluss des Komplementsystems

Im klinischen Rahmen der Organtransplantation wird der Aktivierung des Komplementsystems ein Beitrag zur Entstehung des primären Transplantatversagens zugesprochen. Nach Ischämie und Reperfusion kommt es vermutlich vermittelt durch Adhäsionsmoleküle der Endotheloberfläche zur Aktivierung des Komplementsystems.

Versuche durch BUERKE et al. [36] am Katzen-Herz-Reperfusionsmodell konnten einen kardioprotektiven Effekt durch Hemmung einer komplementabhängigen Teilkomponente (durch Zugabe eines C1q-Esteraseinbibitors) vor Reperfusion aufzeigen. Ebenso konnten DOBSCHÜTZ et al. [37] durch eine Komplementhemmung mit sCR1 (soluble complement receptor type 1) in in vivo-Versuchen am Rattenpankreas eine Verbesserung der Mikrozirkulation nach Ischämie aufzeigen. Gleichartige Ergebnisse erbrachten Untersuchungen von LEHMANN et al. [38] an Rattenlebern. Die Komplementblockade mit sCR1 war auch in diesem Modell in der Lage, den Ischämie-/ Reperfusionsschadens deutlich zu reduzieren.

Im Unterschied zu diesen in vivo-Versuchen konnte der Zusatz von Plasma als Komplementquelle zum Perfusionsmedium in dem hier verwandten isolierten Kaninchenlungenmodell keine Aggravierung des Reperfusionsschadens bewirken, wie vorausgegangene Versuche der Arbeitsgruppe zeigten.

#### 1.3.4. Einfluss von Lipidmediatoren

In der pulmonalen Zirkulation spielen Lipidmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene sowie Thromboxan A<sub>2</sub> insbesondere unter akut-inflammatorischen Bedingungen wie Sepsis und ARDS, sowie pulmonalem Hypertonus eine wichtige Rolle (GRIMMINGER et al. [9]). Ausgelöst durch Stimulation oder eine Schädigung der Zellmembran werden aus langkettigen, ungesättigten Fettsäuren wie z.B. der Arachidonsäure verschiedene Prostaglandinmetabolite mit Hilfe der intrazellulären Prostaglandinsynthese synthetisiert. Je nach Ursprungsgewebe (z.B. Endothelzellen, Thrombozyten, Leukozyten) haben diese unterschiedliche, z.T. gegensätzliche Wirkungen. Bradykinin, Acetylcholin und Histamin vermögen die Synthese und Freisetzung zu steigern. Prostaglandinderivate können nicht gespeichert werden. Ihre Freisetzung erfolgt durch Neusynthese und ihre Halbwertszeit ist sehr kurz (um eine Minute). Somit ist ihre Reichweite beschränkt (BUDDECKE [39]).

In der pulmonalen Strombahn bewirken Prostaglandin (PGE<sub>1</sub>) und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) eine starke Vaso- und Bronchodilatation. Prostazyklin hemmt außerdem die Thrombozytenaggregation. Zusätzlich wirken beide Lipidmediatoren antiinflammatorisch. Eine Hemmung der Adhärenz und der Aktivierung von neutrophilen Granulo-



zyten (Chemotaxis, Generierung von ROS, Degranulation) konnten CHOPRA und WEBSTER [40] bereits 1988 dokumentieren.  $\text{PGE}_1$  und evtl. auch  $\text{PGI}_2$  können über die Hemmung neutrophiler Effektorfunktionen, möglicherweise aber auch unabhängig davon, einer Ödembildung entgegenwirken. Auf diese Weise konnten die beiden Arachidonsäuremetabolite auch zu einer effektiveren Konservierung von Spenderlungen („Flush“ mit Präservationslösung) im Rahmen von Lungentransplantationen beitragen (MATHE et al. [41], MONCADA et al. [42], MENCONI et al. [43], SMITH [44]).

Thromboxan  $\text{A}_2$  ist ein Hauptprodukt des Arachidonsäurestoffwechsels der Thrombozyten (HAMBERG et al. [45]) und spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen. Hauptsächlich bewirkt Thromboxan  $\text{A}_2$  eine Aktivierung der Thrombozytenfunktion und führt zur Kontraktion der glatten Muskulatur (HAMBERG et al. [45], MONCADA und VANE [42], BHAGWAT et al. [46], HALUSHKA et al. [47], GOODMAN et al. [48]). Auf diese Weise fördert es die Thrombozytenaggregation und bewirkt eine Vaso- bzw. Bronchokonstriktion. Thromboxan  $\text{A}_2$  ist aufgrund seiner Wirkung als funktioneller Antagonist zu  $\text{PGI}_2$  und  $\text{PGE}_1$  anzusehen, so BOIE et al. [49]. Thromboxan  $\text{A}_2$  zerfällt sehr schnell (nach etwa 30 Sekunden) durch eine spontane, nicht-enzymatische Hydrolyse in das stabile, aber inaktive Thromboxan  $\text{B}_2$ .

Leukotriene sind chemisch den Prostaglandinen und dem Thromboxan verwandt. Ebenso wie die Prostaglandine werden sie aus Arachidonsäure bzw. Eikosapentaensäure synthetisiert. Unter physiologischen Bedingungen sind Leukotriene im wesentlichen Mediatoren im Rahmen von allergischen und entzündlichen Reaktionen. Sie können im systemischen Kreislauf eine Hypotension bewirken und bereits in sehr geringen Konzentrationen Koronararterien, periphere Pulmonalarterien sowie die peripheren Bronchien durch Kontraktion der glatten Muskulatur verengen (Leukotrien  $\text{C}_4$  und  $\text{D}_4$ ). Der Abbau der Leukotriene erfolgt in der Lunge, den Nieren und der Leber (BEROWITZ et al. [50], SAMUELSSON et al. [51], BUDDECKE [39], GOODMAN und GILMAN [48]).

Eine penibel ausgewogene Balance zwischen diesen Arachidonsäurederivaten stellt somit einen wichtigen rheologischen sowie vasoaktiven Steuerungsmechanismus

dar. Sie haben in vivo einen entscheidenden Einfluss auf entzündliche und allergische Reaktionen und tragen in diesem Rahmen vermutlich in nicht unerheblichen Maße zum Ischämie-/ Reperfusionsschaden bei.

### 1.3.5. Die alveolo-epitheliale Barrierefunktion

Das Lungenepithel besteht aus den squamösen Typ I- und den kubischen Typ II-Alveolarepithelzellen. Ca. 95% der Alveolaroberfläche wird durch die Typ I- Alveolarzellen ausgekleidet. Durch ihr dünnes, attenuiertes Zytoplasma wird die Diffusionsstrecke zwischen Blut und Alveolarraum verkürzt und der Gasaustausch erleichtert. Die Typ II-Alveolarzellen hingegen beanspruchen nur etwa 5% der Oberfläche, sezernieren den Surfactant, eine grenzflächenaktive Substanz, die die alveoläre Oberflächenspannung reduziert und auf diese Weise einer Atelektasenbildung entgegenwirkt. Weiterhin sind sie für Regenerations- und Reparationsvorgänge in der Alveole verantwortlich (DOBBS [52], MASON und SHANNON [53]).

Für die Aufrechterhaltung der alveolo-epithelialen Barrierefunktion sind nach bisherigen Erkenntnissen mehrere Systeme verantwortlich:

- 1.) Durch den transzellulären Weg können Flüssigkeiten, Ionen und Proteine aktiv und passiv transportiert werden (LUCE [54]). Zum einen besitzen hierzu die Alveolar Typ-II-Zellen funktionell und strukturell unterschiedliche Membranen an der apikalen und an der basolateralen Seite. Spezifische Proteine können so den Flüssigkeits- und Ionentransport regulieren (z.B.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Kan}$ al,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ). So wird beispielsweise durch den transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Transport zur basolateralen Seite die Flüssigkeit im Alveolarraum reduziert. Zum anderen können Proteine z.B. mit Hilfe des Golgi-Apparats und Endosomen transportiert werden (KIM [55], YEAMAN et al. [56]).
- 2.) Weiterhin können auf parazellulärem Weg Stoffe zwischen dem Alveolar- und Epithelialraum verschoben werden. Dies geschieht mit Hilfe spezieller Zelladhäsionskomplexe und Zytoskelettorganisationen, die den Zell-Zell-Kontakt und die Zellverbindung der extrazellulären Matrix beeinflussen können. Hierzu sind die interzellulären, junktionalen Komplexe der Alveolar Typ-II-Zellen ver-

antwortlich. Sie bestehen aus vier Hauptkomponenten: den zonulae occludentes (tight junctions), den zonulae adherentes, den maculae adherentes und den Nexus (gap junctions). Im Wesentlichen regulieren die tight junctions den parazellulären Stofftransport und sind damit entscheidend an der Aufrechterhaltung der epithelialen und endothelialen Barrierefunktion beteiligt. Physiologische und pathologische Stimuli können diese Barriere beeinflussen. Signalmoleküle wie Tyrosinkinasen, cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , Proteinkinase C, heterotrimeres G-Protein und Phospholipase C beeinflussen vermutlich die tight junctions (BARTELS et al. [57], MANDARA [58], ANDERSON et al. [59], BHAT et al. [60], ANDERSON und VAN ITALIE [61], BALDA und MATTER [62], LUCE [54]).

Welche Schäden im Rahmen des Ischämie-/ Reperfusionssyndroms auf die Mikrozirkulation und die epitheliale Schrankenfunktion entstehen und worin die Ursachen liegen, wurde in einigen Forschungsprojekten untersucht. So zeigten KHIMENKO et al. [63] in Versuchen an isolierten Rattenlungen, dass der Funktionsfähigkeit des aktiven epithelialen Natriumtransportes eine wichtige Rolle zur Antagonisierung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens zukommt. Die Befunde an lungentransplantierten Patienten durch WARE et al. [64] deuten auf eine Beeinträchtigung des Alveolarepithels unter Ischämie-/ Reperfusionsbedingungen hin. An kollabierten ischämischen Ratten- und Kaninchenlungen konnten SAKUMA et al. [65] einen positiven Effekt durch die Applikation von Superoxid-Dismutase (SOD) und N(omega)-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME) auf die alveoläre Flüssigkeitsreabsorption aufzeigen. Unter hypoxischen Bedingungen sank ebenfalls die Kapazität des epithelialen Flüssigkeitstransports, so SAKUMA et al. [66]. PITTET et al. [67] sahen in den Ergebnissen ihrer Versuche in einem Modell des hämorrhagischen Schocks der Ratte sogar Anzeichen dafür, dass alveoläres NO den alveolären Flüssigkeitstransport reduziert.

### **1.3.6. Rolle des Mediators Stickstoffmonoxid**

Bis in die späten 80iger Jahre spielte Stickstoffmonoxid (NO) in der biomedizinischen Forschung und der klinischen Praxis lediglich eine marginale Rolle. Bekannt war, dass NO als toxischer Luftschadstoff bei Verbrennungsvorgängen (z.B. Abgasemis-

sionen, Zigarettenrauch) entsteht und in höheren Konzentrationen zentralnervös dämpfend wirkt, Vergiftungserscheinungen (Schwindel, Benommenheit, Bewusstlosigkeit) auszulösen vermag, zur Methämoglobinbildung führt und als Lungenreizstoff eine Schädigung des Alveolarepithels und eine kapilläre Permeabilitätsstörung bis hin zum interstitiellen Lungenödem auszulösen vermag (KAROW und LANG [68]).

Erst als IGNARRO et al. [69] und PALMER et al. [70] 1987 den körpereigenen, gefäßerweiternden Stoff EDRF (endothelium-derived-relaxing-factor) identifizierten und bewiesen, dass es sich hierbei um das Molekül NO handelt, rückte NO näher in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Inzwischen ist bekannt, dass endogen produziertes NO im menschlichen Organismus eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Funktionen übernimmt: Diese erstrecken sich von der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase durch die Regulation des Gefäßtonus und somit des lokalen Blutflusses (MONCADA et al. [71]), über eine bronchodilatative Wirkung, einen Einfluss auf die mikrovaskuläre Schrankenfunktion (JOHNSTON et al. [72]), dem Einfluss auf die Plättchenaggregation (FURLONG et al. [73]) über eine Funktion als Neurotransmitter (GARTHWAITE et al. [74]) bis hin zum immunregulatorischen Agens, das regulatorische Funktionen besitzt (MONCADA et al. [71], MARTIN und SANCHEZ-FERRER [75], Johns [76]).

In der vorgestellten Arbeit liegt das besondere Augenmerk auf dem Zusammenhang zwischen der endogenen NO-Liberation durch das Gefäßendothel und dem Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf diese. Daher seien kurz die bisher bekannten Regulations-, Synthese- und Wirkungsmechanismen beschrieben:

NO wird vom Gefäßendothel von nahezu allen Säugertierzellen gebildet und freigesetzt. Grundvoraussetzung hierzu sind nach ALTURA und CHAND [77] intakte Endothelzellen.

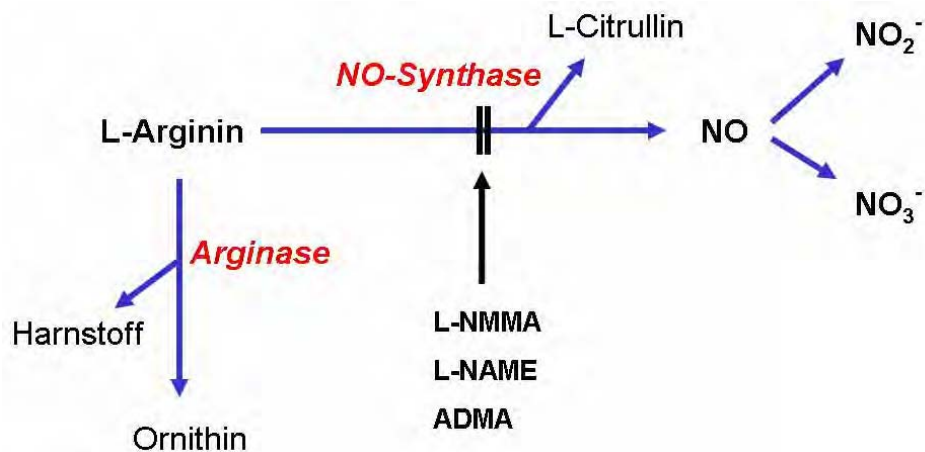
Mehrere Stimuli können über eine Aktivierung der NO-Synthase zur endothelialen NO-Freisetzung führen:

- Zum einen besteht die Möglichkeit der rezeptorvermittelten Stimulation der NO-Synthase. Mediatoren wie Acetylcholin, Serotonin, Thrombin, Histamin und Bra-

dykinin können über die Aktivierung der Guanylatzyklase eine NO-Liberation bewirken (WHITTLE und LOPEZ-BELMONTE [78], KAROW und LANG-ROTH [79]).

- Zum anderen werden, wohl vermittelt durch die mechanische Scher- bzw. Schubspannung des vorbeiströmenden Blutes, Makromoleküle an der endothelialen Oberfläche zur Auslenkung gebracht. Auf diese Weise werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geöffnet und es kommt zur Aktivierung der konstitutiven NO-Synthase (cNOS), wie es SCHILLING et al. [80] und BUSSE et al. [81] beschrieben.
- Des weiteren zeigten Versuche von EVANS et al. [82] und BUGA et al. [83], dass NO im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus die endotheliale NO-Synthase und somit seine eigene Freisetzung hemmen kann. Damit besteht die Möglichkeit, dass sich der basale Gefäßtonus autoregulierte und an die durch den Blutstrom ausgelösten Schub- und Scherspannungen anpasst (WILSON et al. [84], MONCADA und PALMER [71]). Dieser Effekt scheint besondere Bedeutung für die Steuerung des vasomotorischen Tonus an den Koronar- und Pulmonalgefäßen zu spielen, wie GROVE et al. [85] und HELBIG und SPIECKERMANN [86] berichten. Weiterhin scheint dieser Mechanismus klinische Bedeutung im Rahmen der arteriellen Hypertonie zu besitzen und ist vermutlich durch körperliche Aktivität verstärkt induzierbar (YEN et al. [87], CAI et al. [88]).

Zur **zellulären Synthese** von Stickstoffmonoxid (NO) dient die basische, semi-essentielle Aminosäure L-Arginin als Substrat. L-Arginin ist im menschlichen Organismus bei zahlreichen Stoffwechselfunktionen von Bedeutung. Eine wesentliche Rolle spielt es z.B. im Harnstoffzyklus, wo L-Arginin in der letzten Zyklusreaktion durch das zytosolische Enzym Arginase unter Bildung von Harnstoff und Ornithin gespalten wird. Somit dient es der Elimination nicht-essentieller, stickstoffhaltiger Verbindungen aus dem Organismus. Dies wurde so bereits 1932 durch KREBS und HENSELEIT [89] beschrieben. Im Rahmen der NO-Synthese katalysiert die NO-Synthase (NOS) die schrittweise ablaufende enzymatische Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin. Hierbei wird NO freigesetzt, wie PALMER et al. [7] und SAKUMA et al. [8] übereinstimmend berichteten (siehe Abb.1.1).



**Abb. 1.1.** Vereinfachte schematische Darstellung des L-Arginin/NO-Stoffwechselweges.

NO-Synthasen katalysieren die Reaktion von L-Arginin zu Citrullin unter Freisetzung von NO. Die NO-Synthasen sind durch L-NMMA, L-NAME, ADMA inhibierbar.

NO wird schnell zu den stabilen Endprodukten Nitrit und Nitrat oxidiert.

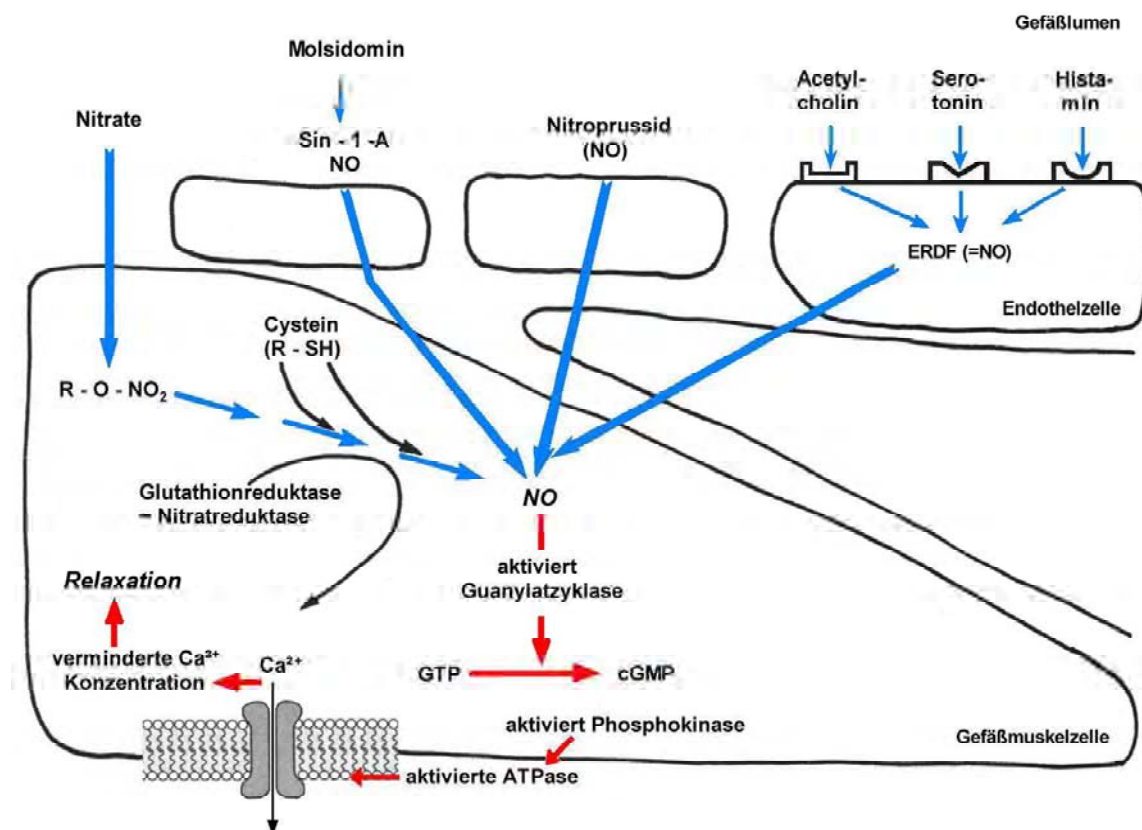
Im Harnstoffzyklus kann das Substrat L-Arginin durch die Arginase zu Harnstoff und Ornithin metabolisiert werden.

Grundsätzlich kann zwischen einer induzierbaren (iNOS) und konstitutiven (cNOS) NO-Synthase unterscheiden werden: Die induzierbare iNOS wird nur vorübergehend gebildet und kann z.B. im Rahmen von entzündlichen Prozessen den NO-Spiegel modulieren (MONCADA und PALMER [71]). Die konstitutive NO-Synthase (cNOS) befindet sich nach GRATHWAITE et al. [74] in Endothelzellen (ecNOS) und im Nervengewebe (ncNOS).

Das gebildete freie NO kann im Gegensatz zu anderen bioaktiven Molekülen nicht gespeichert werden. Daher wird es ständig, moduliert durch externe Stimuli, gebildet. Zur Wirkungsvermittlung muss es weder aktiv durch Exozytose aus der Zelle herausgeschleust werden, noch benötigt es spezifische extrazelluläre Rezeptoren. Das kleine, gut wasserlösliche Molekül kann mühelos durch Zellmembranen diffundieren und gelangt so ins Zytosol. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit (6-50 Sekunden) besitzt es aber einen begrenzten Reaktionsradius. NO wird schnell zu Nitrit und Nitrat oxidiert.

Die **Signaltransduktion** erfolgt in der Zielzelle über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase. Diese bewirkt die Umwandlung von GTP (Guanosin-Triphosphat) zum second messenger cGMP (zyklisches Guanosin-Monophosphat). Eine erhöhte intrazelluläre cGMP-Konzentration initiiert als Botenstoff eine Vielzahl von NO-assoziierten Effekten (s.o.).

cGMP aktiviert z.B. in der *Gefäßmuskelzelle* und an der *Bronchusmuskulatur* eine membrangebundene Phosphokinase, die wiederum eine ATPase in der Zellmembran durch Phosphorylierung aktiviert. Daraufhin pumpt diese Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus der Zelle heraus und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sinkt. Eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zur Relaxation der glatten Gefäß- oder Bronchialmuskulatur und folglich zur Vaso- oder Bronchodilatation (KÜTTLER [90], siehe Abb. 1.2.).



**Abb. 1.2.** Wirkmechanismus von organischen Nitraten, Molsidomin, Nitroprussid-Natrium und EDRF

- SIN-1-A: aktiver Metabolit des Molsidomin;
- cGMP: zyklisches Guanosin-Monophosphat (second messenger)
- GTP: Guanosin-Triphosphat

Neuere Untersuchungen zeigen, dass NO an *Alveolarzellen* vermutlich in die Funktion der alveolo-epitheliale Barrierenfunktion eingreift, indem es aktive transzelluläre und parazelluläre Transportmechanismen und somit die alveolare Flüssigkeitsreabsorption beeinflusst (siehe Kap.1.3.5).

Einige der oben beschriebenen Effekte wurden in den letzten Jahren in klinischen Studien untersucht: Inhalativ appliziertes NO vermochte eine selektive pulmonale Vasodilatation hervorzurufen und so eine deutlich verbesserte Oxygenierung bei Patienten mit pulmonalerarterieller Hypertonie, beim akutem Lungenversagen des Erwachsenen (ARDS, adult respiratory distress syndroms) und dem akuten Lungenversagen von Neugeborenen (IRDS, infant respiratory distress syndroms) bewirken, wie es ZAPOL et al. [91] und GERLACH et al. [156] berichteten.

Weiterhin werden seit Jahren im klinischen Alltag NO-liberierende Medikamente in Form von organischen Nitraten, Molsidomin, Nitroprussid-Natrium u.a. zur Behandlung des arteriellen Hypertonus oder der koronaren Herzkrankheit verabreicht.

Zur **Inhibition der NO-Liberation** stehen (z.T. nur zu experimentellen Zwecken) einige Substanzen zur Verfügung. So besteht eine Möglichkeit darin, die Aufnahme des Substrates L-Arginin in die Zelle kompetitiv zu hemmen. Hier kommen z.B. Ornithin oder Lysin zur Anwendung. Ein weiterer Weg ist die Inhibition der NO-Synthase durch die Gabe von L-Arginin-Analoga. Diese intrazellulär wirkenden Substanzen sind z.B. die nicht selektiven, kompetitiven NO-Synthase-Hemmer L-NAME (Nitro-L-Arginin Methylester), ADMA (asymetrisches Dimethylarginin) oder das in dieser Arbeit verwandte L-NMMA (N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin). Hochselektive NO-Synthase-Hemmer befinden sich derzeit in pharmakologischer Entwicklung und könnten Bedeutung im klinischen Einsatz - z.B. im Rahmen der Therapie des septischen Schocks - erlangen, wie dies McDERMOTT [93], VALANCE et al. [94] SOUTHAN et al. [95] und CHINELLATO et al. [96] beschrieben.

Der Einfluss von **Ischämie-/ Reperfusionseignissen** auf die Integrität der NO-Synthase und einer möglichen Änderung der NO-Liberation ist bisher nicht direkt untersucht worden. Die Rolle des NOs wird kontrovers diskutiert und der Stellenwert des pulmonalen NO/cGMP-Systems ist unklar:



Unbestritten kommt es beim Ischämie-/ Reperfusionsschaden zum respiratorischen Versagen in Folge eines nicht-kardial bedingten interstitiellen Lungenödems mit einer Erhöhung des vaskulären Widerstands (CHRISTIE et al. [5]). Die Inhalation von exogen zugeführtem NO erschienen PINSKY et al. [97] eine Erfolg versprechende Therapie. Sie vermuteten eine Beeinträchtigung der endogenen NO-Synthese durch vaskuläre Reaktionen in den reperfundierten Lungen. Diese Ansicht wurde in vielen experimentellen Studien geteilt, wie z.B. bei BARBOTIN-LARRIEU et al. [98], CHETHAM et al. [99], MURAKAMI et al. [100] und HERMLE et al. [16]. So zeigten Versuche, dass inhalatives NO zum Zeitpunkt der Reperfusion den zu erwartenden mikrovaskulären Schaden verringern konnte. Einige Autoren sprachen diesem Effekt, unabhängig von der Vasodilatation, dem antiinflammatorischen NO-Potenzial zu, u.a. POSS et al. [101] und GUIDOT et al. [102]). Vermittelt durch zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) (CHETHAM et al. [99]) kommt es hierbei zu einer Hemmung der Adhärenz und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (SEEGER et al. [103]) Möglicherweise bewirkt NO auch eine Hemmung der neutrophilen Effektorfunktionen (CHANG et al. [104]).

Weiterhin wird einer ungestörten endogenen NO-Produktion ein protektiver Effekt im Zusammenhang mit dem Ischämie-/ Reperfusionsschaden zugesprochen. Mehrere Studien legen dies in Ischämie-/ Reperfusionsversuchen nahe, wie es SATO et al. [105] an Hunden, WILLIAMS et al. [106] an Kaninchen, MASINI et al. [107] an Schweineherzen, COTTART et al. [108] an der Rattenleber, IWATA et al. [109] an der Katzen-Magen-Mucosa und KUBES et al. [110] am Dünndarm von Katzen demonstrieren konnten. LU et al. [111] beschrieben einen protektiven Effekt durch endogen produziertes NO vor dem Ischämie-/ Reperfusionsschaden in Blut-perfundierten Rattenlungen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Beeinträchtigung der NO-Produktion unter Ischämie-/ Reperfusionsbedingungen zu einer signifikanten endothelialen Dysfunktion führen könnte.

Im Widerspruch hierzu wurde allerdings in zahlreichen Versuchen ein protektiver Effekt vor dem Ischämie-/ Reperfusionsschaden durch die Inhibition der endogenen Stickstoffmonoxidsynthese beschrieben. Ischämie-/ Reperfusionsversuche von FLÖGEL et al. [112] an Mäuseherzen, von YU et al. [113] am proximalen Tubulus von Rattennieren, von PHAN et al. [114] an Kaninchen-Skelettmuskeln und von NISHIKAWA et al. [115] an Katzegehirnen erbrachten diese kontroversen Ergebnisse.

Weiterhin stellte sich in anderen Studien die inhalative NO-Applikation als ineffektiv oder sogar kontraproduktiv heraus (PINSKY et al. [97], NAKA et al. [116]). Andererseits konnte hier die Gabe eines cGMP-Analogons den Reperfusionsschaden mindern.

Die nachteiligen Effekte der inhalativen NO-Applikation deuten darauf hin, dass es möglicherweise neben der Stimulation der löslichen Guanylatzyklase zu anderen, nachteiligen Effekten kommt. Diese könnten aus einer dosisabhängigen direkten Schädigung des Alveolarepithels durch NO, oder aus einer verstärkten Generation von Peroxinitrit bzw. anderer radikaler Sauerstoffspezies (ROS) in der pulmonalen Zirkulation resultieren. Ohnehin wird vermutet, dass es auch ohne eine zusätzliche NO-Applikation während der Reperfusion zur Reaktion zwischen endogen produziertem NO und dem inhalativen Sauerstoff mit Bildung des stark oxidativ wirkenden Peroxinitrits kommt. Die so vermittelten proinflammatorischen Eigenschaften könnten die oben beschriebenen Beobachtungen erklären.

Abweichend von diesen Ansätzen vermuteten LOPEZ-NEBLINA et al. [117] anhand ihrer Ergebnisse an Rattennieren, dass es beim Ischämie-/ Reperfusionsschaden zu einem Wirkungsverlust des endogenen NOs kommen könnte.

Darüber hinaus haben sich nur wenige Untersuchungen mit der Bedeutung der endogenen NO-Synthese während einer Ischämie-/ Reperfusionperiode befaßt. Folglich soll das Verhalten der NO-Liberation in dieser Arbeit eingehend untersucht werden.

### **1.3.7. Biophysikalische Parameter**

Es besteht eine besondere Abhängigkeit des pulmonalen Ischämie-/ Reperfusionsschadens von biophysikalischen Parametern. Neben dem Einfluss von Organ-, Perfusat- und Atemtemperatur werden der Stoffwechsel und die Integrität der pulmonalen Zellpopulationen durch die mechanischen Variablen der Beatmung und der Perfusion beeinflusst (alveoläre und vaskuläre Distension). Untersuchungen der letzten Jahre wiesen auf die Möglichkeit der Modulation des Reperfusionsschadens mittels alveolärer Distension durch Ventilation während der Ischämiephase hin (HAMVAS et al. [118], SCHÜTTE et al. [119]). Frühere Untersuchungen u.a. auch dieser Arbeits-

gruppe ergaben, dass sich eine zyklisch durchgeführte Lungendehnung mit Hilfe einer volumenkontrollierten Überdruckbeatmung im Ischämieintervall protektiv auf den zu erwartenden Ischämie-/ Reperfusionsschaden auswirkt. Dieser Effekt war unabhängig von der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration. Dies wurde von SCHÜTTE et al. [119] an der isolierten Kaninchenlunge und HAMVAS et al. [118] an in vivo durchgeführten Hundelungen-Versuchen aufgezeigt. Weiterhin zeigten BECKER et al. [120] und SCHÜTTE et al. [119], dass eine bestehende vasale Distension während einer Ischämieperiode die Schwere des Ischämie-/ Reperfusionsschadens zu reduzieren vermochte. Diese Beobachtung konnte sowohl nach einer oxisch als auch nach einer anoxisch ventilierten Ischämie nachgewiesen werden.

SCHÜTTE bezeichnete diese Effekte als „biophysikalische Protektion“ und subsumierte darunter alle nicht pharmakologisch beeinflusste Rahmenbedingungen, die die Ischämietoleranz des Organs erhöhten.

#### **1.4. Zielsetzung der vorgestellten Dissertationsarbeit**

In der vorgestellten Dissertationsarbeit soll die Rolle des endogenen NOs für die Generation des Ischämie-/ Reperfusionsschadens im Modell der isolierten Kaninchenlunge genauer untersucht werden. Hierzu musste zunächst das schon in Versuchen von SCHÜTTE et al. [119] und HERMLE et al. [16] eingesetzte experimentelle Ischämie-/ Reperfusionsmodell um eine intravasale und eine exhalative NO-Messung erweitert werden. So konnte während der gesamten Versuchszeit die NO-Konzentration im Exhalat und die Akkumulation der NO-Oxidationsprodukte im Perfusat online gemessen werden.

Die Lungen wurden einer normoxisch sowie einer anoxisch ventilierten Ischämieperiode ausgesetzt. Aus vorangegangenen Versuchen von SCHÜTTE et al. [119] konnte abgeleitet werden, dass der Fortbestand der normoxischen Ventilation während der Ischämieperiode zu einer signifikanten Verminderung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens im isolierten Kaninchenlungen-Modell führt. Inwieweit dieser Effekt direkt mit der Präsenz von NO zusammenhängt, ist bis dato nicht näher untersucht worden. Basierend auf der Erkenntnis, dass sich der Ischämie-/ Reperfusionsschaden deutlich unter den Bedingungen von periischämisch kollabierten Gefäßen im Unterschied zur vasalen Distension erhöht (SCHÜTTE et al. [119] und BECKER et al. [120]),

sollte weiterhin untersucht werden, inwieweit sich dieser Effekt in einer abweichenden pulmonalen NO-Liberation begründet.

Zudem sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat die Ischämie-/ Reperfusion auf die NO-Synthese?
- Inwieweit wird der pulmonale Ischämie-/ Reperfusionsschaden durch die unspezifische Hemmung der endogenen NO-Synthese mit Hilfe des N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) beeinflusst? Kann durch die Blockade der endogenen NO-Synthase der Ischämie-/ Reperfusionsschaden begrenzt werden?
- Welche Rolle spielt die Anwesenheit von Sauerstoff während der Ischämieperiode?
- Lässt sich der Ischämie-/ Reperfusionsschaden durch Eliminierung von Sauerstoff-Radikalen durch das exogen zugeführte Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) begrenzen?



- Datenerfassungs- und Korrekturprogramm für TurboPascal, ©1998 Mayer (Gießen)
- Druckaufnehmer Combitrans® Monitoring-Set, Braun (Melsungen)
- Edelstahlrohre VSR 80 (Innendurchmesser 2,06 und 4 mm), Dockweiler (Oststeinbek)
- Excel®, Office®, Microsoft Corporation ©1983-1999 (USA)
- Frigomix® U, Braun (Melsungen)
- Gasdurchflussmesser SNAP-IN 10A6132/42, Bailey-Fischer & Porter (Göttingen)
- Gasmischanlage KM 60-4 ME SO, Witt (Witten)
- Grafik- und Datenerfassungsprogramm Labtech Notebook Pro V9.02 für Windows 3.1, © 1994 Laboratory Technologies (Wilmington, USA)
- Heizschlauch PILZ® Typ oDIT, Isopad (Heidelberg)
- Infusionspumpe IVAC 531-1, Ivac Infusion Pump (San Diego, USA)
- Kugelhähne 2-Wege (SS-43S6MM) und 3-Wege (SS-43XSS6M), B.E.S.T. (Frankfurt a.M.)
- Laborspülmaschine, Mielabor G 7783, Miele (Gütersloh)
- Laborprogramm, Notebook Pro™, Labtech, Spectra Computersysteme (Leinfelden-Echterdingen)
- Magnetische Schlauchklemmen, Sirai Typ Z323D, Novodirect (Kehl/Rhein)
- Mehrfachschreiber Servomed, Hellige (Freiburg)
- Messverstärker für Wägezelle, HBM ME 30 Hottinger Baldwin Meßtechnik (Langen)
- Nahtmaterial, Mersilene 4,1 SH, Ethicon (Norderstedt)
- Perfusionsfilter, Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm, Pall Biomedical (Fajardo, Perfusionssystemschläuche „arterieller Schenkel“, Tygon, Kalensee (Gießen)
- Perfusionssystemschläuche „venöser Schenkel“, PVC, Sorin Biomedica (Düsseldorf)
- PlotIt® 3.1 und 3.22 für Windows, Scientific Programming Enterprises (Haslett, USA)
- Rollerpumpe Masterflex™ 7518-10, Masterflex (Barrington, USA)
- Starling Beatmungspumpe, Cat/Rabbit Ventilator 6025, Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)

- Temperaturmesser ALMEND® 2290-3, Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
- Thermomix® B, Braun (Melsungen)
- Thermomix® UB, Braun (Melsungen)
- TurboPascal™, Borland International (München)
- Ultraschall-Flußmesser T101, Transonic System (Ithaka, USA)
- Venenpunktionsbesteck, W.I.N. 25 G, Abott (Sligo, Irland)
- Wägezelle U1-G, Hottinger Baldwin Meßtechnik (Langen)
- X-Y Schreiber, Rikadenki R 50 Series, Rikadenki Electronics (Freiburg)

## **2.2. Material und Geräte für die Chemilumineszenzmessung**

### **2.2.1. Eingesetzte Gase und Agenzien**

- Aqua destillata, Braun (Melsungen)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro analysi, Merck (Darmstadt)
- KJ pro analysi, Merck (Darmstadt)
- KNO<sub>2</sub> pro analysi, Merck (Darmstadt)
- KOH pro analysi, Merck (Darmstadt)
- Natriumnitrat (NaNO<sub>3</sub>) pro analysi, Merck (Darmstadt)
- Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>) pro analysi, Merck (Darmstadt)
- Salzsäure 37% rauchend pro analysi, Merck (Darmstadt)
- Sauerstoff 4.5, Messer-Griesheim (Siegen)
- Stickstoff 5.0, Messer-Griesheim (Siegen)
- Stickstoffmonoxid 97,3 ppb (pro analysis), Messer-Griesheim (Siegen)
- Stickstoffmonoxid 100 ppb und 800 ppm (pro analysis), Messer-Griesheim (Siegen)
- Vanadium(III)-Chlorid, Merck (Darmstadt)

### **2.2.2. Geräte und Hilfsmittel**

- Aktivkohle, Fluka (Bern, Schweiz)
- Chemilumineszenzdetektor UPK 3100, UPM (Langgöns)

- Glasgefäß beheizbar (150 ml) mit Glasfritte (Porengröße 3), Kalensee (Gießen)
- Glaskolben 2-glasig, Kalensee (Gießen)
- Infusionsrollerpumpe ISMATEC IP 12 SA 8031, Ismatec (Zürich, Schweiz)
- Injectomat S, Fresenius (Bad Homburg)
- Jacket Intensivkühler, Kalensee (Gießen)
- Kühlfalle (100 ml), Kalensee (Gießen)
- Magnetrührer IKAMAR<sup>®</sup> REO, Jahke & Kunkel (Staufen i. Br.)
- Membran-Vakuumpumpe S/N 103473, UPM (Langgöns)
- Mikrometer-Ventil, Messer-Griesheim (Siegen)
- Pumpenschläuche Tygon (Innendurchmesser 0,95 und 2,06 mm), Kalensee (Gießen)
- Teflonfilter Typ LS 5,0µm, Millipore (Eschborn)
- Thermomix<sup>®</sup> UB, Braun (Melsungen)
- Thermomix<sup>®</sup> BU, Braun (Melsungen)
- Umwälzpumpe Litte Giant<sup>™</sup>, Litte Giant Pump (Oklahoma City, USA)

Hersteller und Lieferanten ohne Angaben zum Herkunftsland sind in Deutschland ansässig.



### **3. Methoden**

#### **3.1. Modell der Isolierten Kaninchenlunge (ILU)**

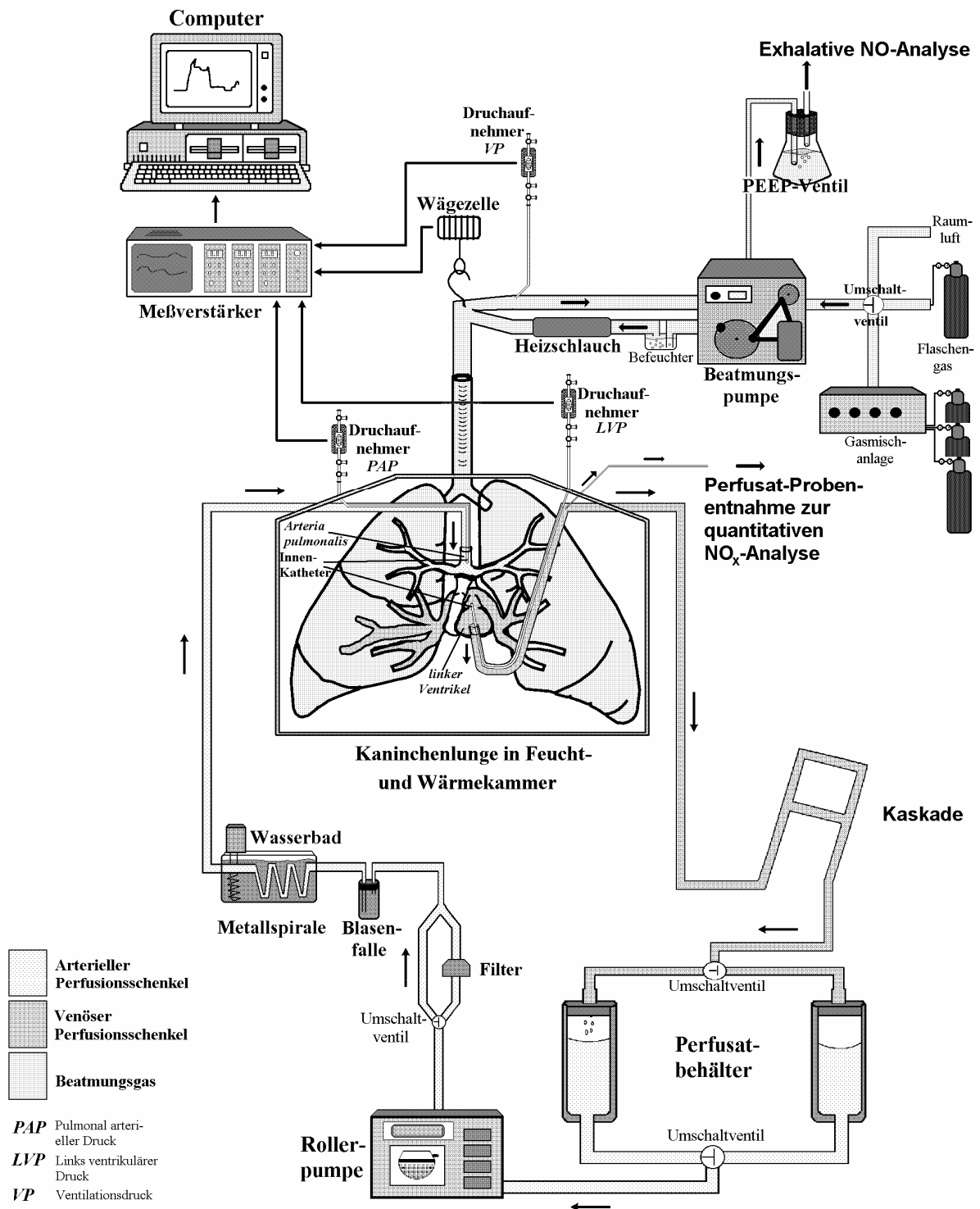
##### **3.1.1. Einführung**

Bereits 1912 beschrieben KNOWLTON und STARLING das Modell der isolierten, blutfrei perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge. Durch Modifikationen und Adaptionen an unterschiedliche Anforderungen bot das intakte isolierte Organ ein von zentralnervösen, humoralen und metabolischen Einflüssen des Gesamtorganismus unabhängiges experimentelles System (SEEGER et al. 1986 [92] und 1994 [103]). Mit Hilfe dieses Modells war es möglich, komplexe biochemische Interaktionen, physiologische und biophysikalische Parameter zu untersuchen. Ebenso konnten gezielt pathologische Zustände induziert und analysiert werden, wie von GRIMMINGER et al. [10], WALMRATH et al. [121] und WEISSMANN et al. [122] beschrieben. Das Modell ermöglichte eine kontinuierliche Erfassung des pulmonalarteriellen und -venösen Drucks, des Beatmungsdrucks sowie des Lungengewichts. Weiterhin bestand die Möglichkeit, Proben aus der Expirationsluft und dem zirkulierenden Perfusat zur chemischen und biochemischen Analyse zu entnehmen.

##### **3.1.2. Versuchsaufbau**

Die isolierte Kaninchenlunge wurde mit Hilfe einer Rollerpumpe (Masterflex™) flusskonstant mit pulsatilem Fluss perfundiert. In dem geschlossenen Kreislauf konnten alternierend zwei temperierte Perfusatbehälter mit einem Volumen von maximal je 300 ml über Dreiwegehähne eingeschaltet werden. Aus der Lunge ausgeschwemmte zelluläre Bestandteile wurden vor Versuchsbeginn mit einem in den Perfusatfluß integrierten Filter (Porengröße 0,2 µm) aus dem System entfernt. Nach dem ersten Perfusatwechsel wurde dieser durch einen Shunt umgangen. Zur Vermeidung arterieller Embolien passierte das Perfusat im Anschluß eine Blasenfalle. Vor Eintritt in die Kaninchenlunge wurde das Perfusat durch ein im Wasserbad (Thermomix® B, Braun) liegendes Spiralrohr aus Edelstahl (Innendurchmesser 2,06 mm) auf 37,8° C temperiert. Im Anschluß gelangte das Perfusat über einen in der Arteria pulmonalis

fixierten arteriellen Katheter in die Lunge. Zur Druckaufnahme war ein Innenkatheter unmittelbar vor der Bifurkation der Arteria pulmonalis platziert. Nach der Lungenpassage floss das Perfusat durch einen im linken Ventrikel befestigten venösen Katheter und anschließend über eine leiterförmige Kaskade zum jeweiligen Perfusatgefäß zurück. Die venöse Druckmessung erfolgte ebenfalls durch einen Innenkatheter, dessen Ende im linken Vorhof platziert war (siehe Abb. 3.1.).



**Abb.: 3.1.** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung und der Position der Messanalytik.

Zu Versuchsbeginn wurde durch Veränderung der Kaskadenhöhe ein linksatrialer Druck von +2,5 mmHg (Bezugspunkt war der Lungenhilus) eingestellt. Somit wurden Zone-3-Bedingungen nach CRYSTAL und WEST 1991 [123] für alle Lungenbezirke in der End-Expiration sichergestellt. Während des Versuches konnte dieser Druck durch das Abklemmen einzelner Sprossen an der Kaskade um weitere 10 cm Wassersäule angehoben werden.

Zur kontinuierlichen Bestimmung der Konzentration der NO-Abbauprodukte im Perfusat wurde dem System unmittelbar nach der Lungenpassage fortlaufend über eine Rollerpumpe (ISMATEC P12, Ismatec) 600 µl/min Perfusat zur NO<sub>x</sub>-Analyse entzogen. Zum Ausgleich des somit entstehenden Perfusatdefizits erfolgte die fortlaufende Zufuhr der äquivalenten Menge an frischem Perfusat über einen Tropfenzähler (IVAC 531, Ivac Infusion Pump Inc.). Der daraus resultierende Verdünnungsfehler wurde nach Versuchsende durch eine computergestützte Korrektur eliminiert (siehe Kapitel 3.4.).

Mit Hilfe einer speziell angefertigten Organ-Aufhängung wurde die isolierte Lunge frei an einer elektronischen Wägezelle (U1-G, Hottinger Baldwin Messtechnik) hängend in der temperierten und wasserdampfgesättigten Organkammer befestigt. Somit konnte das Lungengewicht kontinuierlich überwacht und ein Auskühlen und Austrocknen des Organs vermieden werden. Die Temperaturregulation des Perfusats und der Lungenkammer erfolgte durch eine Heiz- und Kühleinrichtung (Thermomix® UB und Frigomix® U-Kombination, Braun), die entsprechend temperiertes Wasser durch die doppelwandigen Glasgefäße pumpte. Nach Anschluss der Lunge an das Perfusatsystem wurde die Temperatur auf 37,8° C eingestellt. Um ein möglichst gleichmäßig temperiertes und wasserdampfgesättigtes Klima im Lungengefäß sicherzustellen, wurde der Gefäßboden mit 30 ml Aqua destillata befüllt.

Die Ventilation der Lunge erfolgte mit einer Beatmungspumpe (Cat/Rabbit Ventilator 6025, Hugo Sachs Elektronik). Während des Versuchsablaufs wurden die in Tab. 3.1. abgebildeten Beatmungsparameter gewählt.

Atemzugvolumen	: 30 ml
Atemfrequenz	: 30 min <sup>-1</sup>
Positiver-endexpiratorischer Druck (PEEP)	: 1 cmH <sub>2</sub> O
Atemgastemperatur	: 38° C

**Tab. 3.1.** Ventilationsparameter während des Versuchsablaufs

Während der Präparation wurde die Lunge nach erfolgter Tracheotomie zunächst mit Raumluft beatmet. Zum Zeitpunkt der Kanülierung der Arteria pulmonalis wurde dem Atemgas CO<sub>2</sub> zur pH-Stabilisierung zugesetzt (weitere Details siehe auch Kap. 3.1.3). Die Lunge konnte wahlweise mit festen Gasgemischen aus Gasflaschen (Messer-Griesheim) oder mit individuell über eine Gasmischanlage (KM 60-4 MESO, Witt) gemischten Gasen ventiliert werden. Mit dem Gasmischer konnten die Anteile an O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> jeweils zwischen 0 und 25 %, die von N<sub>2</sub> von 0-100 % variiert werden. Die Gaskonzentrationen wurden mit einem Blutgasanalysator (ABL 330, Radiometer) wiederholt kontrolliert.

Auf dem Weg zur Lunge durchströmte das Gasgemisch zunächst einen mit Aqua destillata befüllten Gasbefeuchter und zur anschließenden Kondensation von überschüssigem Wasser eine Wasserfalle. Mit Hilfe eines Temperaturfühlers (Almend 2290-3, Hugo Sachs Elektronik) und eines Heizschlauches (PILZ® Typ oDIT, Isopad GmbH) konnte ein Computerregelkreis die Beatmungstemperatur auf 38° C einstellen.

Der exhalative Gasweg beinhaltete eine weitere Wasserfalle und ein PEEP-Ventil, das einen endexpiratorischen Druck von 1 cm Wassersäule erzeugte. Am Ausgang des PEEP-Ventils wurde eine kontinuierliche Atemgasprobe entnommen und direkt dem NO-Analysator (UPK 3100, UPM) zugeführt (siehe Kapitel 3.3.4).

Perfundiert wurde die Kaninchenlunge mit steriler Krebs-Henseleit-hydroxyethylstärkehaltiger Pufferlösung (KHHB, Serag-Wiessner AG), die folgende Zusammensetzung aufwies:

NaCl	120,00 mmol
KCl	4,30 mmol
CaCl <sub>2</sub>	2,40 mmol
MgCl <sub>2</sub>	1,30 mmol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,10 mmol
Glucose	13,32 mmol
Hydroxyethylstärke	50,00 g
NaHCO <sub>3</sub>	23,0 ml/l

**Tab. 3.2.** Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Hydroxyethylstärke-Pufferlösung (KHHB)

Bei Beatmung mit einem CO<sub>2</sub>-haltigen Atemgasgemisch ergab sich ein physiologischer pH-Wert von 7,35 – 7,45 in der rezirkulierenden Pufferlösung. Die Entnahme der Perfusatproben zur Kontrolle des pH-Wertes erfolgte direkt nach der Organpassage aus dem linken Ventrikel und wurde mit Hilfe des Blutgasanalysegerätes bestimmt.

Initial erfolgte die Perfusion nach Kanülierung der Arteria pulmonalis mit einem Fluss von 10 ml/min. Innerhalb von 5 Minuten wurde der Fluss langsam auf 100 ml/min gesteigert. Nachdem das Perfusat verbliebene Blutbestandteile aus dem Organ herausgeschwemmt hatte, wurde ein erster Perfusatwechsel durchgeführt und der Filter aus dem Perfusatfluss genommen. Ein weiterer Perfusatwechsel erfolgte unmittelbar vor dem eigentlichen Versuchsbeginn. Während der darauf folgenden 20-minütigen steady-state-Phase blieb die isolierte Lunge gewichts- und druckstabil. Das exhalative NO befand sich auf einem konstanten Plateauniveau und der intravasale NO<sub>x</sub>-Anteil akkumulierte mit gleichmäßiger Steigung.

### 3.1.3. Präparation der isolierten Kaninchenlunge

Zur Präparation wurden männliche und weibliche Kaninchen der Rasse „New Zealand Bastard“ mit einem Körpergewicht zwischen 2,4 und 2,9 kg und einem Alter von 4-5 Monaten verwandt.

Die Sedation der Kaninchen erfolgte nach Punktion einer marginalen Ohrvene durch Injektion von 400 µl eines Gemisches aus Ketamin (Ketanest®) und Xylazin (Rompun®) (Mischverhältnis 2:3). Zur Antikoagulation erfolgte anschließend die Applikation von 1000 I.E. Heparin (Liquemin®) pro kg Körpergewicht. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, wurde bei erhaltener Spontanatmung der Bereich 3 cm unterhalb des Larynx mit Lidocain 2% (Xylocain®) lokal anästhesiert.

Schmerzfrei konnte nun durch schichtweise Präparation, unter Schonung der großen Halsgefäße und des Nervus Vagus die Trachea freigelegt und mobilisiert werden. Nach Tracheotomie wurde ein Endotrachealtubus eingebracht und mit einer äußeren Ligatur fixiert. Die Beatmung erfolgte über eine Beatmungspumpe mit 30 ml Hubvolumen und einer Frequenz von 30 min<sup>-1</sup>. Initial erfolgte die Ventilation mit Raumluft bei einem endexpiratorischen Druck von 0 cmH<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Narkose durch sukzessive Gabe des Narkosegemisches unter Kontrolle der Herz- und Kreislauffunktion vertieft.

Nun erfolgte die weiträumige Mobilisation der Haut über dem Sternum und den Rippenbögen. Über eine Inzision kaudal des Processus xiphoideus wurde das Abdomen eröffnet. Die Orientierung konnte deutlich erleichtert werden, indem die Bauchmuskulatur durch zwei großzügige, flankierende Schnitte entlang der Rippenbögen durchtrennt und eine am Processus xiphoideus anbrachte Klemme nach ventral gezogen wurde. So stellte sich das Diaphragma gut einsehbar dar und konnte von der vorderen unteren Thoraxapertur gelöst werden. Der ventrale Anteil des Diaphragmas wurde mit einer weiteren Klemme nach kaudal gezogen und somit waren das Mediastinum und die Pleuren eröffnet.

Im nächsten Schritt folgte die mediane Sternotomie. Mit Hilfe zweier Klemmen konnten die entstandenen Thoraxhälften nach lateral gezogen werden. Auf diese Weise entstand ein übersichtlicher Einblick in den Thorax und die Präparation konnte

mit der stumpfen Entfernung des Thymus fortgesetzt werden. Anschließend wurde das Perikard eröffnet und die Aorta sowie die Arteria pulmonalis mit jeweils einer Ligatur umschlungen.

Parallel mit der Umstellung des Beatmungsgases auf 21% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub> und 73,7% N<sub>2</sub> erfolgte die Inzision des rechten Ventrikels und das sofortige Einbringen des arteriellen Katheters (Innendurchmesser 3 mm). Dieser wurde bis in die Arteria pulmonalis vorgeschoben und mit der vorgelegten Ligatur fixiert. Zur Vermeidung von Luftembolien wurde die Perfusionspumpe schon vor dem Einbinden des Katheters mit einem Fluß von 10 ml/min gestartet. In unmittelbarem Anschluss erfolgten die Resektion der linken Ventrikelspitze, die Entfernung der Mitralklappe und der zugehörigen Papillarmuskeln. Somit konnte das Perfusat nach der Lungenpassage ungehindert abfließen und es wurde eine stauungsbedingte venöse Druckbelastung der Lungenstrombahn vermieden. Nachfolgend wurde die Aorta durch das Knüpfen der zweiten Ligatur verschlossen und das Herz-Lungen-Präparat vom großen Körperkreislauf getrennt. Eine weitere Ligatur wurde unmittelbar cranial des Diaphragmas angelegt und verschloss Aorta, Vena cava inferior, Ösophagus, Ductus thoracicus und Reste des mediastinalen Bindegewebes.

Zur vollständigen Explantation des Herz-Lungen-Pakets mussten nun die großen cervicalen Gefäße dorsal und lateral der Trachea durchtrennt, das mediastinale Bindegewebe vorsichtig gelöst und die ligierten Gefäße unterhalb des Diaphragmas durchtrennt werden. Eine fehlerfreie Druck- und Gewichtsmessung wurde nach der Entfernung des rechten Ventrikels und der Ligatur des linken Herzohrs ermöglicht. Um ein geschlossenes, rezirkulierendes Perfusionssystem zu erhalten, wurde nach Anlage einer intramuralen Tabaksbeutelnaht der perfusatrückführende venöse Katheter (Innendurchmesser 6 mm) im linken Ventrikel fixiert.

Im letzten Schritt wurde die Lunge an der Wägezelle in der Organkammer befestigt, die Beatmungsschläuche durch das Atemgas temperier- und befeuchtbare Schlauchsystem ersetzt und das rezirkulierende Perfusionssystem geschlossen. Im Anschluss daran wurde der Perfusionsfluss schrittweise auf 100 ml/min erhöht.

### 3.1.4. Pflege und Wartung der Perfusionssysteme

Besondere Sorgfalt galt bei der Versuchsvorbereitung den Perfusionssystemen. Um Verunreinigungen vorzubeugen, luftblasenfrei und steril perfundieren zu können, wurden folgende Maßnahmen ergriffen:

- Abwechselnd wurden mehrere identische Schlauchsysteme und Perfusatgefäße eingesetzt.
- Vor Versuchsbeginn wurden sterile Perfusatgefäße und Schlauchsysteme am Arbeitsplatz montiert.
- Das Perfusionssystem wurde vor dem Versuch bei einem Flow von 600 ml/min mit 2 Liter Aqua ad iniectabilia (Pharmacia & Upjohn), 2 Liter isotoni-scher Kochsalzlösung (Pharmacia & Upjohn) und 2 Liter Perfusionslösung (Serag-Wiessner AG) gespült und entlüftet.
- Die Innenkatheter und Druckmeßkammern der Druckaufnehmer wurden luftblasenfrei mit Aqua ad iniectabilia befüllt.
- Am Versuchende wurde die Lunge aus dem System entfernt, das Perfusions-system an dieser Stelle durch einen Shunt kurzgeschlossen und mit 2 Liter Aqua destillata bei einem Flow von 600 ml/min vorgespült.
- Umgehend erfolgte die manuelle Zerlegung und mechanische Reinigung mit Bürsten. Anschließend wurde das Schlauchsystem in einer Laborspülma-schine (Mielabor G 7783, Miele) bei 60°C gespült.
- Die gesäuberten Teile wurden anschließend bei 30°C im Wärmeschränk (Mo-dell 500, memmert) über 12 Stunden getrocknet. Verbliebene Wasserreste wurden mit Druckluft ausgeblasen.
- Das System wurde in Tüten verschweißt und in der Zentralsterilisation der Universitätsklinik Gießen mit Formaldehyd sterilisiert.
- Die gläsernen Bestandteile (z.B. Perfusatgefäße) wurden bei 200°C im Wärmeschränk (Modell 200, memmert) über einen Zeitraum von 4 Stunden sterilisiert.

Durch dieses Vorgehen war, wie frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. W. Seeger (z.B. SCHÜTTE et al. [11]) zeigten, eine endotoxinfreie Perfusion des isolierten Organs möglich.



## 3.2. Messparameter

### 3.2.1. Druck- und Gewichtsregistrierung

Zur kontinuierlichen Messung des pulmonalarteriellen und linksventrikulären Drucks wurden mit Aqua destillata gefüllte Innenkatheter (Innendurchmesser 1 mm) eingesetzt, deren Spitze sich an den Meßstellen der Pulmonalarterie und des linken Vorhofs befanden. Der Beatmungsdruck wurde am Tubus mit einem luftgefüllten Druckschlauch erfasst. Die Druckwerte wurden kontinuierlich mit elektromagnetischen Druckwandlern (Combitrans<sup>®</sup>, Braun) registriert. Vor jedem Versuch wurde ein Nullabgleich auf Höhe des Lungenhilus durchgeführt. Einmal monatlich wurden die Druckaufnehmer mit einem Kalibrationsgerät nach Prof. O. H. Gauer (Hugo Sachs Elektronik) kontrolliert.

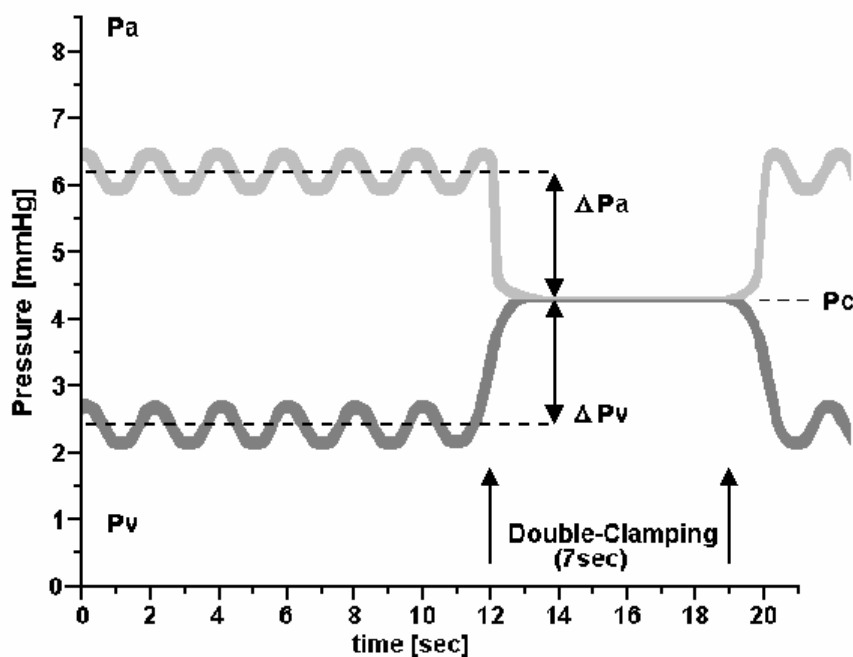
Die kontinuierliche Erfassung des Lungengewichts ermöglichte eine analoge, elektronische Wägezelle (U1-G, Hottinger Baldwin Messtechnik) und die Signalverstärkung erfolgte durch einen Messverstärker (HBM ME-30, Hugo Sachs Elektronik). Aufgezeichnet wurden die Meßwerte zum einen über einen X-Y-Schreiber (R-50, Rikadenki Electronics) und zum anderen mit einem Computer. Die Kalibration der Wägezelle erfolgte zu Versuchsbeginn mittels eines bekannten Eichgewichts (10 g).

Mit Hilfe des Mehrkanalschreibers (Servomed, Hellige) wurden die Druckwerte analog erfasst und zusammen mit den Gewichtsdaten mittels einer AD/DA-Wandlerkarte (Decision PCL-818HG bi, Spectra Computersysteme GmbH) online digitalisiert. Auf dem Personalcomputer konnten die Messergebnisse mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Laborprogramms (Notebook Pro<sup>™</sup>, Labtech) aufgezeichnet und graphisch dargestellt werden.

### 3.2.2. „Double-Clamping“-/ „Double-Occlusion“-Technik zur Erfassung der mikrovaskulären Druckwerte

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung des mikrovaskulären Drucks die Technik des „Double-Clampings“ (= Double-Occlusion) eingesetzt (DAWSON et al. [124], TOWNSLEY et al. [125], HAKIM [126], LINEHAN et al. [127] und COPE et al. [128]). Der mikrovaskuläre Druck wurde gemessen, um potentielle hydrostatische Einflüsse auf die kapilläre Permeabilität und die Ödembildung der isolierten Lunge erfassen zu können.

Die „Double-Clamping“-Messung basiert auf der modellhaften Vorstellung, dass der vaskuläre Widerstand und die vaskuläre Compliance unter Flow-Stop Bedingungen von in Reihe geschalteten, einteilbaren Gefäßkompartimenten abhängig ist. So kommt es nach dem gleichzeitigen Verschluss des arteriellen und venösen Perfusionsschenkels zum Druckausgleich im gesamten Gefäßbett (siehe Abb. 3.2.). Der resultierende Ausgleichsdruck entspricht dann dem aktuellen Kapillardruck ( $P_c$ ) (HAKIM und KELLY [129], BARMAN et al. [130], AUDI et al. [131]).



**Abb. 3.2.** Schematischer Druckverlauf während eines „Double-Clamping“-Manövers. Die Abbildung zeigt, wie sich nach plötzlichem Perfusions- und Ventilationsstop der arterielle ( $P_a$ ) und venöse Druck ( $P_v$ ) bis zum Druckausgleich annähern. Dieser Druck entspricht dem Kapillardruck ( $P_c$ ).

Zur Realisierung dieser Messung wurden zwei Magnetventile in das Perfusions-system integriert. Eine spezielle Computerroutine ermöglichte nach dem Start über eine Tastenkombination den exakt synchronen Verschluss des arteriellen und venösen Perfusionschenkels für einen definierten Zeitraum von 7 Sekunden. Auf diese Weise konnten definierte „Flow-Stop“-Bedingungen erzielt werden. Die arteriellen und venösen Druckwerte wurden bei diesen Manövern jeweils mit einer erhöhten Messfrequenz von 20 Hz aufgezeichnet. Im Anschluß öffneten sich die Magnetventile automatisch wieder und sprangen in die Ausgangsposition zurück.

Nach Beendigung des jeweiligen Versuchs wurden die erhobenen Messdaten computergestützt ausgewertet und es konnten Aussagen über den mikrovaskulären Druck zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten getroffen werden. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass wiederholte „Double-Clamping“-Messungen nach diesem Verfahren gut reproduzierbare Messwerte erbrachten und die Organfunktion nicht beeinträchtigt wurde.

### **3.2.3. Ermittlung des kapillären Filtrationskoeffizienten ( $K_{fc}$ ), der vaskulären Compliance und der Retention**

Zur quantitativen Erfassung der Permeabilität des Lungengefäßbetts wurde das bereits etablierte Verfahren zur Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ( $K_{fc}$ ) angewandt (WANGENSTEEN et al. [132], STAUB et al. [133], CHANG und VOELKEL [104], NUNN [134], SEEGER et al. [103]).

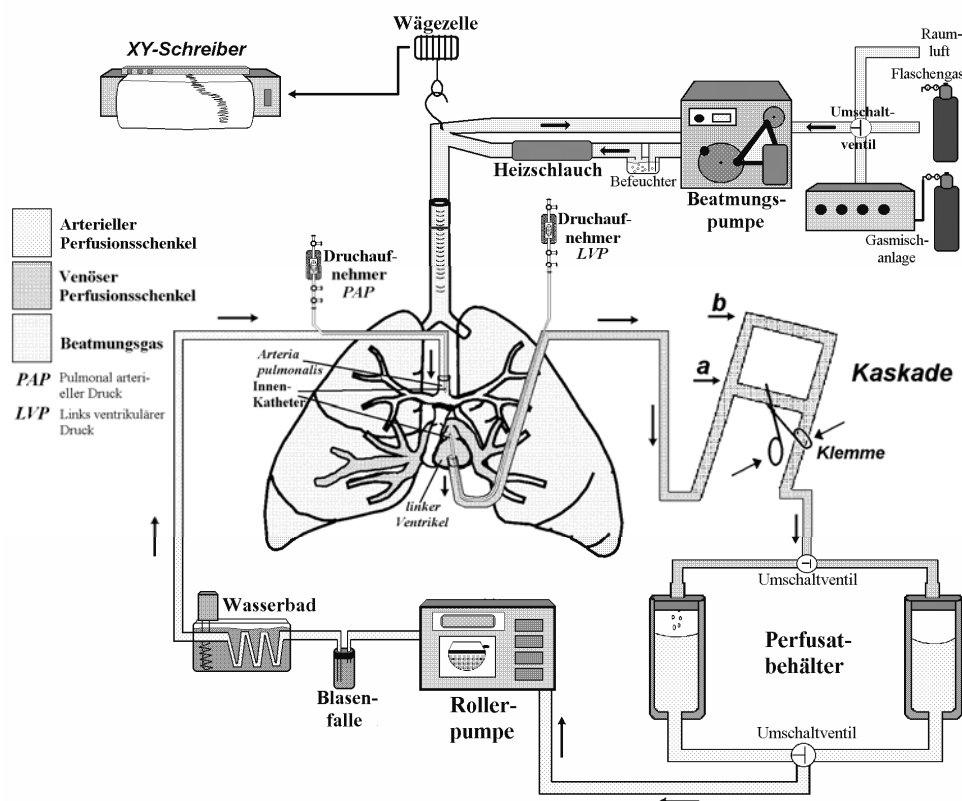
Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte die Integrität des Organs vor dem Ischämieanö-ver und der nach Reperfusion eingetretene Permeabilitätsschaden bewertet werden. Der kapilläre Filtrationskoeffizient ( $K_{fc}$ ) ist das Produkt aus hydraulischer Leitfähigkeit ( $L_p$ ) und Filtrationsoberfläche ( $F$ ) eines Gefäßbetts (SCHMIDT und THEWS [135], SILBERNAGEL und LANG [136]).

$$K_{fc} = L_p \cdot F \quad \text{Gl. 3.1.}$$

Der Faktor  $L_p$  beschreibt hierbei das Wasservolumen, das pro Zeit, Fläche und Druckdifferenz durch eine Membran filtrierte wird.

Zur Ermittlung des Kfc-Wertes wurde die Lunge für eine definierte Zeit (8 Minuten) einer hydrostatischen Druckbelastung ausgesetzt. Hierbei kam es initial zu einer sprunghaften Gewichtszunahme. Diese beschrieb die Füllung des Gefäßbetts und charakterisierte somit die Gefäßcompliance. Im unmittelbaren Anschluss folgte eine kontinuierliche Gewichtszunahme, deren Steigung von der Permeabilität der Gefäßwände abhängig war. Somit lies sich anhand der Kurvencharakteristik eine Permeabilitätsstörung einschätzen. Je schneller sich ein neues Gleichgewicht zwischen den intra- und extravasalen Flüssigkeitsvolumina einstellte, umso geringer war der Kapillarschaden zu bewerten. Zeigte sich hingegen eine lineare Steigung der Kurve und fand sich kein neues Gleichgewicht zwischen dem kapillären und interstitiellen Druck, so lag ein fulminanter Kapillarschaden vor und das Perfusat wurde kontinuierlich in das Gewebe filtriert.

Die vorgestellten Kfc-Messungen erfolgten während einer hydrostatischen linksatrialen Druckerhöhung von 10 cmH<sub>2</sub>O für jeweils 8 Minuten. Der Perfusionsfluss wurde während der Messung nicht verändert und verblieb bei 100 ml/min. Technisch wurde dieses Manöver mit Hilfe einer leiterförmigen Schlauchkaskade im Perfusat-Rückfluss realisiert. Durch das Abklemmen einzelner Sprossen konnte man den venösen Druck entsprechend erhöhen bzw. senken (siehe Abb. 3.3. Position a und b).



**Abb. 3.3.** Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des  $K_{fc}$ 's, der vaskulären Compliance und der Retention.

Auch wiederholte hydrostatische Druckbelastungen an Kontroll-Lungen zeigten weitgehend konstante, niedrige Kfc-Werte, so dass eine gravierende hydrostatische Schädigung der Kapillarstrombahn durch die Versuchsanordnung selbst unwahrscheinlich erscheint.

Um den Kfc-Wert, die Compliance und die Retention später graphisch auswerten zu können, wurde zur Gewichtsaufzeichnung während dieses Manövers ein XY-Schreiber (Rikadenki) zugeschaltet.

Die initiale Gewichtszunahme der Lunge wurde definiert als Schnittpunkt einer Vertikalen zum Zeitpunkt 0 mit der Tangente an den Kurvenverlauf zum Zeitpunkt 2 Minuten. Die Compliance wurde dann mit der Dimension ml/cmH<sub>2</sub>O angegeben.

Die Ermittlung der Kfc-Werte erfolgte zu den Zeitpunkten 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Minuten aus der Steigung der Gewichtskurve durch Anlage von Tangenten. Da diese einzelnen Kfc-Werte durch den jeweiligen interstitiellen Druck beeinflusst werden, erfolgte eine computergestützte Extrapolation auf den Zeitpunkt t=0 (Übersicht und mathematische Herleitung NUNN [134]).

In den vorliegenden Versuchen wurde dieser Kfc-Wert auf das Feuchtgewicht der Lunge bezogen und erhielt damit die Dimension:

$$\left[ \frac{cm^3}{s \cdot cmH_2O \cdot g(Feuchtgewicht) \cdot 10^4} \right]$$

Die Gewichtsretention wurde in Beziehung zum Ausgangswert 5 Minuten nach Beendigung dieser hydrostatischen Druckbelastung gebildet und in Gramm ausgedrückt.

### 3.3. NO<sub>x</sub> – Analytik

#### 3.3.1 Messprinzip der Chemilumineszenz

Die NO-Analyse erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch zwei Stickoxidanalysatoren (UPK 3100, UPM). Ein Gerät erfasste kontinuierlich die NO-Konzentration im exhalativen Atemgas der Kaninchenlunge; das zweite bestimmte in Verbindung mit einer

vorgeschalteten Vanadium(III)Chlorid-Säule die Menge an gelöstem  $\text{NO}_x$  im Perfusat.

Zunächst soll das Messprinzip der Chemilumineszenz zur quantitativen Erfassung von freiem gasförmigen NO kurz beschrieben werden:

Zur Bestimmung des NO-Anteils im Messgas musste dieses zunächst im Vakuum mit Ozon zur Reaktion gebracht werden. Dabei entstand aus NO das energetisch angeregte  $\text{NO}_2^*$ , welches unmittelbar nach dieser Reaktion in den energieärmeren Grundzustand  $\text{NO}_2$  überging. Beim Übergang vom energetisch angeregten in den energetisch günstigeren Grundzustand wurden Photonen emittiert. Diese „Lichtblitze“ haben eine Wellenlänge, die sich von 600 nm (sichtbares Licht) bis etwa 780 nm (Infrarotbereich) erstreckt. Zur Quantifizierung dieser Lichtquanten wurden diese zunächst gefiltert, anschließend mit Hilfe eines Photomultipliers verstärkt und letztlich in ein Stromsignal umgewandelt. Die freiwerdende Lichtintensität kann so als direktes Maß der NO-Konzentration herangezogen werden.

Der Mechanismus der Chemilumineszenz bei der Reaktion von NO mit Ozon wurde in mehreren Publikationen (CLYNE et al. [137], CLOUGH und TRUSH [138], HUI und COOL [139]) genauer untersucht und beschrieben. Die Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Konstanzhaltung von Temperatur, Druck, Volumen und der Sicherung eines Ozonüberschusses in der Reaktionskammer die Chemilumineszenz bei der Reaktion von NO mit Ozon in besonderem Maße für die quantitative Bestimmung von gasförmigem NO geeignet ist. Es besteht eine außerordentlich gute Linearität, eine Sensitivität bis in den ppt-Bereich sowie eine inhärente Spezifität, so FONTIJN et al. [140]. Daher finden Messgeräte basierend auf diesem Messprinzip seit Jahren ihre kommerzielle Anwendung, u.a. in der staatlichen Umweltmesstechnik.

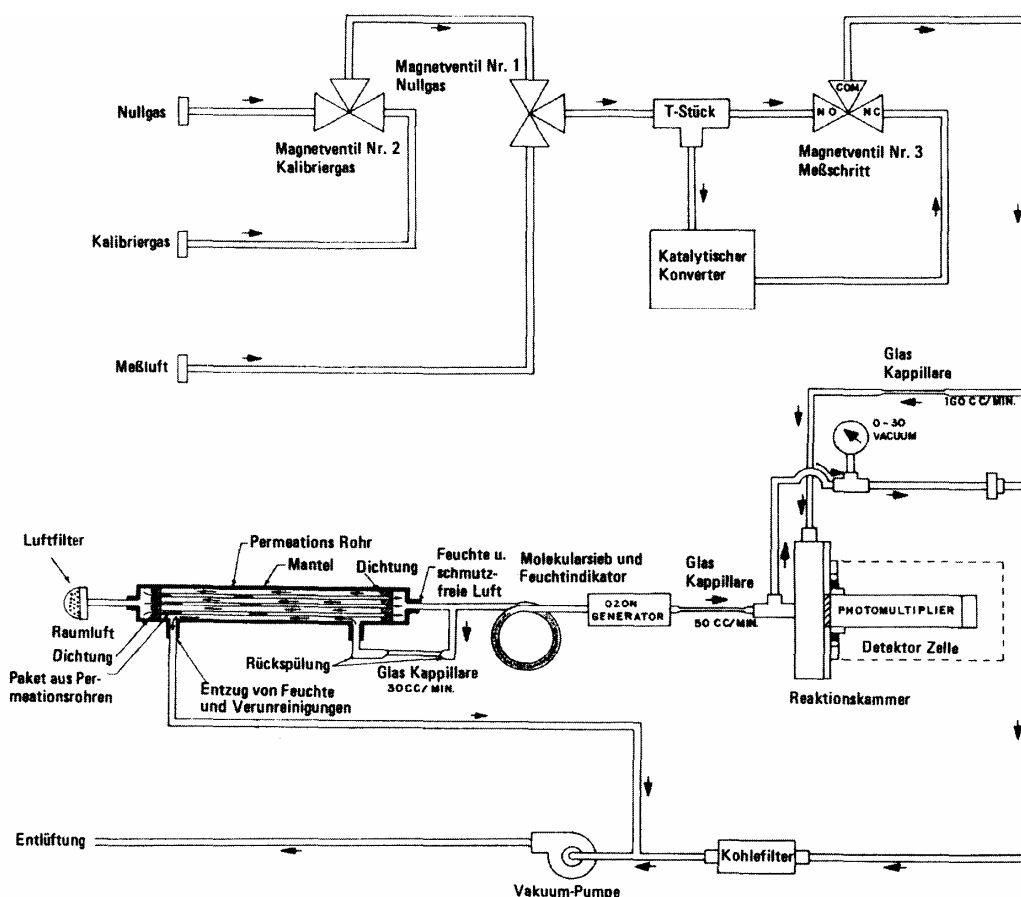
### 3.3.2 Aufbau des Chemilumineszenzdetektors UPK 3100

Zur Analyse des Messgases musste dieses in der Reaktionskammer mit Ozon zusammentreffen. Hierzu wurden 160 ml/min des Messgases über eine strömungsbegrenzende Glaskapillare zur Reaktionskammer befördert. Das benötigte Ozon wurde durch einen Ozongenerator aus Raumluft erzeugt, nachdem dieses mit einem Permeationstrockner und weiteren Trocknungsmitteln von Feuchtigkeit befreit worden

war. Über eine Glaskapillare (50 ml/min) erreichte das Ozon dann die Reaktionskammer. Eine Vakuumpumpe war für die Aufrechterhaltung der Gasflüsse und zur Erzeugung eines Vakuums von -0,8 bis -1,0 bar in der Reaktionskammer verantwortlich.

Die Reaktionskammer wurde zur Vermeidung von Kondensationen auf 45°C temperiert. Hier fand die oben beschriebene Reaktion von  $\text{NO} + \text{O}_3$  zum angeregten  $\text{NO}_2^*$  statt. Sie benötigte etwa 12 Sekunden. Anschließend verließ das Messgas-Ozon-Gemisch den Detektor über einen Aktivkohlefilter. So konnte überschüssiges, reaktives Ozon eliminiert werden (siehe Abb. 3.4.).

Die vom angeregten  $\text{NO}_2^*$  emittierten Photonen wurden mittels eines Lichtfilters (ISO 9001 DT Red-Filter, Balzers) gefiltert, mit dem Head-On R374 Photomultiplier (Hamamatsu) verstärkt und in ein Stromsignal umgewandelt. Die weitere Verarbeitung des Detektorsignals erfolgte in einem Elektrometerverstärker mit anschließender Digitalisierung durch einen 12 bit AD-Wandler.



**Abb. 3.4.** Gasfluss-Diagramm des Chemilumineszenzdetektors UPK 3100.

Die erhobenen Messdaten wurden online mittels einer seriellen Schnittstelle auf einen Computer übertragen. Mit Hilfe eines eigens für diesen Zweck in Turbo Pascal™ geschriebenen Computerprogramms (©1995, K. Mayer) erfolgte die Aufzeichnung der Messdaten mit einer Frequenz von 1 Hz und die graphische Darstellung auf einem Monitor.

### **3.3.3 Wartung und Pflege der Chemilumineszenzdetektoren**

Um den störungsfreien Betrieb der Geräte sicherzustellen, wurden diese vor jedem Versuch mit Carbogen (Messer-Griesheim) als Nullgas und Stickstoffmonoxid 100 ppb (Gas zu Eichzwecken, Messer-Griesheim) als Kalibriergasprobe geeicht. Regelmäßige Wartungsarbeiten wie der Wechsel der Aktivkohlefilter, Teflonfilter und Pumpenmembranen wurden nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

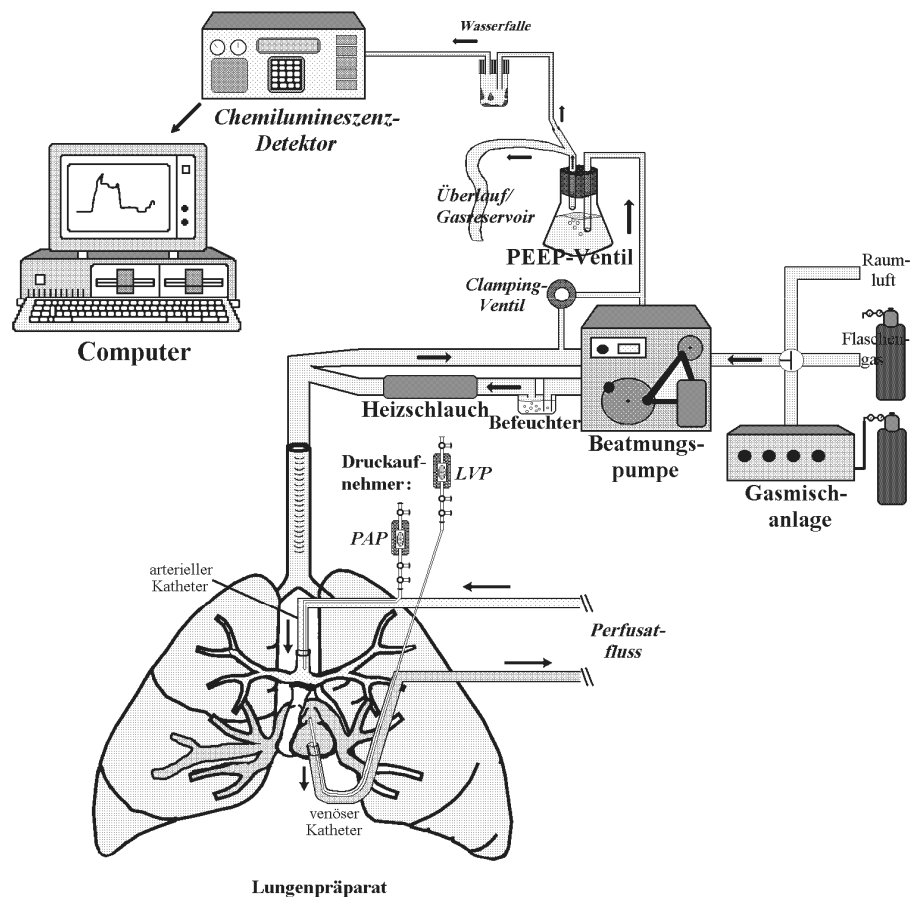
### **3.3.4 Integration der NO-Analytik zur Konzentrationsbestimmung im exhalativen Atemgas**

Die Analyse des gasförmigen NO-Gehalts in der Expirationsluft der Kaninchenlunge konnte mit wenigen Eingriffen in das System realisiert werden (siehe Abb. 3.5.). Die Entnahmestelle wurde unmittelbar hinter dem PEEP-Ventil eingerichtet, so dass der positive endexpiratorische Druck (PEEP) von 1 cmH<sub>2</sub>O von dieser Maßnahme unbeeinflusst blieb. Da die Ventilation des Atemgases naturgemäß diskontinuierlich erfolgte, die NO-Analyse des Exhalats allerdings aus einem kontinuierlichen Gasfluss durchgeführt wurde, musste ein Vermischen der Expirations- mit der Raumluft verhindert werden. Hierzu wurde dem PEEP-Ventil ein Y-förmiges Verbindungsstück nachgeschaltet, welches den exhalativen Beatmungsschenkel teilte. Ein Schenkel wurde als Gasreservoir und Überlauf (PVC-Schlauch der Länge 5 m, Innendurchmesser 10 mm) genutzt, während der andere Schenkel zur kontinuierlichen Entnahme der Atemgasprobe diente.

Im weiteren Verlauf durchströmte das Analysegas auf dem Weg zum Stickoxidanalysator noch eine mit Eis gekühlte Wasserfalle, um mögliche Wasseranteile zur Kondensation zu bringen. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die Reakti-



onskammer des Messgerätes nicht durch kondensierendes Wasser beschädigt wurde. Insgesamt betrug das Expirationsvolumen der Lunge 900 ml/min, das Messgasvolumen 160 ml/min.



**Abb. 3.5.** Integration der exhalativen NO-Messung.

### 3.3.5 Messprinzip zur Erfassung der im Perfusat gelösten oxidativen Endprodukte ( $\text{NO}_x$ ) mit Hilfe der Vanadium(III)Chlorid-Reaktionskammer

$\text{NO}$  ist ein in sauerstoffhaltigen Flüssigkeiten chemisch instabiles Molekül und unterliegt einer raschen Oxidation. Die weiteren Produkte dieses Reaktionsweges sind Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), die man als  $\text{NO}_x$  zusammenfasst. Zur kontinuierlichen Erfassung dieser Oxidationsprodukte wurde eine Methode eingesetzt, bei der  $\text{NO}_x$  durch Vanadium(III)Chlorid, einem starken Reduktionsmittel, quantitativ zu  $\text{NO}$  reduziert und anschließend mittels Chemilumineszenz detektiert wurde. Diese Methode basiert auf Untersuchungen von BRAMAN und HENDRIX

[141] und wurde u.a. von SPRIESTERSBACH [142] und GESSLER [143] angewendet und beschrieben.

Da Vanadium(III)Chlorid eine schnelle Reaktionskinetik, hohe Sensitivität und Selektivität aufweist und auch in niedriger Konzentration noch quantitativ  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  zu NO reduzierten kann, wurde es in der vorliegenden Arbeit als Reduktionsmittel eingesetzt. Selbst eine Verdünnung des 0,1 M  $\text{VCl}_3$  auf eine Konzentration von 0,001 M (also das 10fache der Ausgangslösung) beeinträchtigt die vollständige und schnelle Reduktion der NO-Oxidationsprodukte nicht (BRAMAN und HENDRIX [141]).

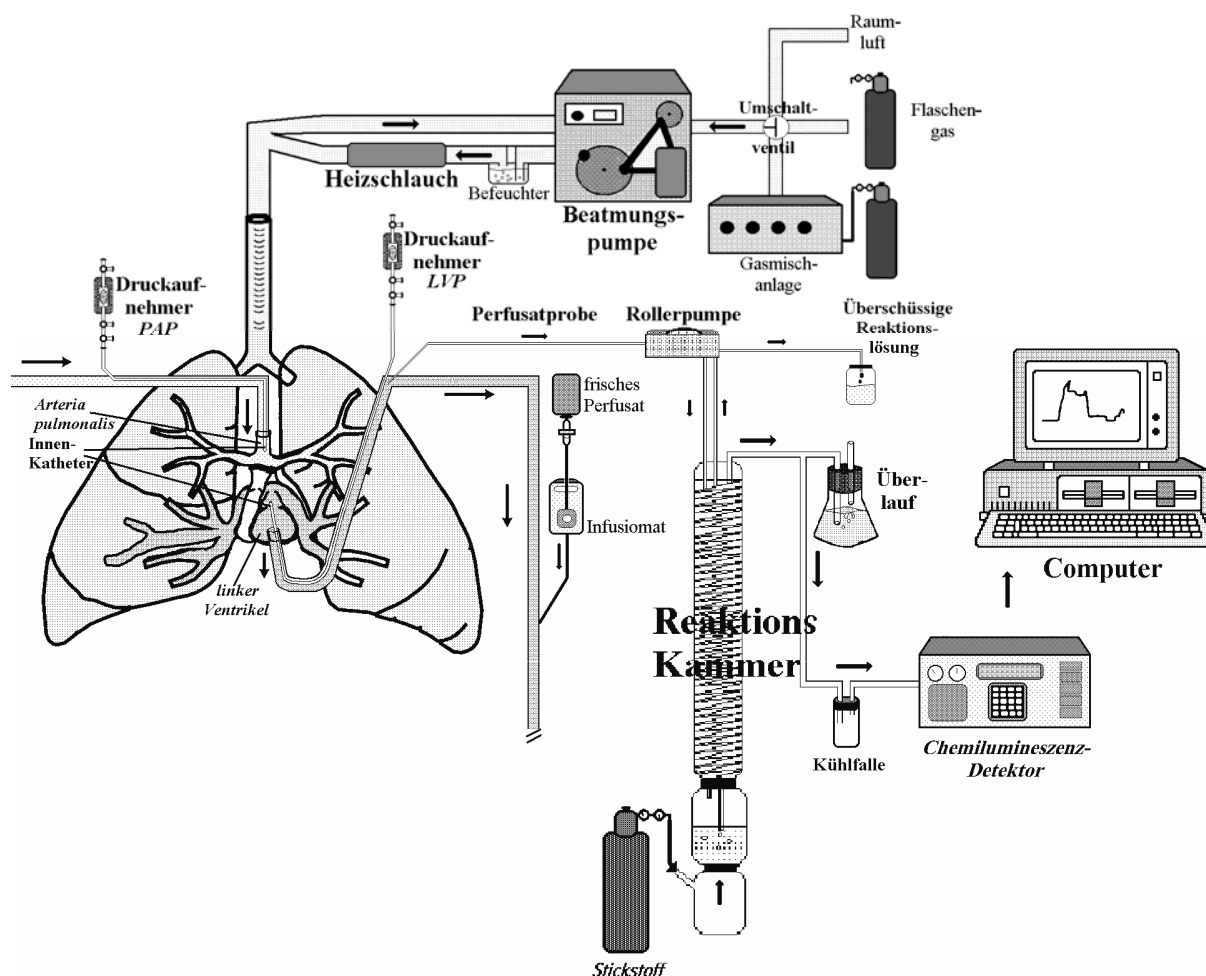
In der Reaktionskammer kommt es bei einer Temperatur von 85° C in Anwesenheit von Vanadium(III)Chlorid und konzentrierter Salzsäure zu folgenden Redoxreaktionen:

$\text{NO}_3^- + 4 \text{H}^+ + 3 \text{e}^-$	$\leftrightarrow$	$\text{NO} + 2 \text{H}_2\text{O}$	
$\text{NO}_2^- + 2 \text{H}^+ + 1 \text{e}^-$	$\leftrightarrow$	$\text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	
$\text{ONOO}^- + \text{H}^+$	$\leftrightarrow$	$\text{ONOOH} \leftrightarrow \text{HO}^\cdot + \text{NO}_2$	(RADI et al. [144])
$\text{HO}^\cdot + \text{NO}_2$	$\leftrightarrow$	$\text{NO}_3^- + \text{H}^+$	weiter 1. Zeile (BECKMANN [145])

**Gl. 3.2.** Redoxreaktionen von Peroxynitrit, Nitrit und Nitrat zu NO.

### 3.3.6. Integration der $\text{NO}_x$ -Analytik zur Erfassung der oxidativen Endprodukte ( $\text{NO}_x$ ) im Perfusat und Aufbau der Vanadium(III)Chlorid-Reaktionskammer

Zur kontinuierlichen quantitativen Bestimmung der NO-Liberation (siehe Abb. 3.6.) wurde dem zirkulierenden Perfusat fortlaufend mit Hilfe einer Rollerpumpe (ISMATEC IP 12, Ismatec) ein Probenvolumen von 600  $\mu\text{l}/\text{min}$  zur Analyse entnommen. Die Probenentnahme erfolgte aus dem venösen Schenkel des Schlauchsystems unmittelbar nach der Lungenpassage durch eine Stahlkanüle. Um eine darin begründete Abnahme des zirkulierenden Perfusatsvolumens zu vermeiden, musste zeitgleich die entsprechende Menge durch frisches Perfusat mit Hilfe einer Infusionspumpe (IVAC 531-1, Ivac Infusion Pump) ergänzt werden.



**Abb. 3.6.** Schematische Darstellung der Integration der  $\text{NO}_x$ -Analytik.

Die Perfusatprobe wurde der Vanadium(III)Chlorid-Reaktionskammer unmittelbar durch eine dünne Teflonkapillare (Innendurchmesser 1 mm) zugeführt. Ein Überlaufen der Reaktionskammer wurde durch eine zweite Kapillare verhindert, die gleichzeitig die korrespondierende Menge an Reaktionslösung entfernte.

Die Reduktion von  $\text{NO}_x$  zu NO erfolgte analog der bereits beschriebenen Methode von SPRIESTERSBACH et al. [142]. Vor Versuchsbeginn wurden 100 ml einer salzsauen (2 M) Vanadium(III)Chlorid-Lösung (0,1 M) in ein beheizbares Reaktionsgefäß mit einer Kapazität von 150 ml (Kalensee) gefüllt und auf 85° C aufgeheizt.

Nach vollständiger chemischer Redoxreaktion musste das entstandene NO zum Chemilumineszenzdetektor (UPK 3100, UPM) transportiert werden. Hierzu strömte  $\text{N}_2$  (Messer-Griesheim) als inertes Trägergas durch eine im Boden eingelassene Glasfritte (Porengröße 3, Kalensee) in die Reaktionskammer und trieb das Messgas durch einen Jacket-Intensivkühler (Kalensee) und eine Kühlfalle 100 ml (Kalensee)

zum Messgerät. Durch die Kühlung konnten Wasserdampf und entwichene Salzsäure zur Kondensation gebracht und eine Kontamination oder Beschädigung des Detektors verhindert werden.

Der N<sub>2</sub>-Trärgasfluß musste täglich mittels eines Mikrometerventils an den Messgasvolumenfluß (ca. 160 ml) im Detektor angepasst werden. Hierzu war der Ablauf T-förmig geteilt:

An einem Schenkel befand sich ein mit Aqua destillata gefüllter Überlauf. Bei zu hohem N<sub>2</sub>-Gasfluß stiegen im Wasser des Überlaufgefäßes Gasblasen auf. Auf diese Weise wurde eine exakte Justierung des Trärgasflusses möglich und ein Überdruck am Messgaseingang des Detektors vermieden.

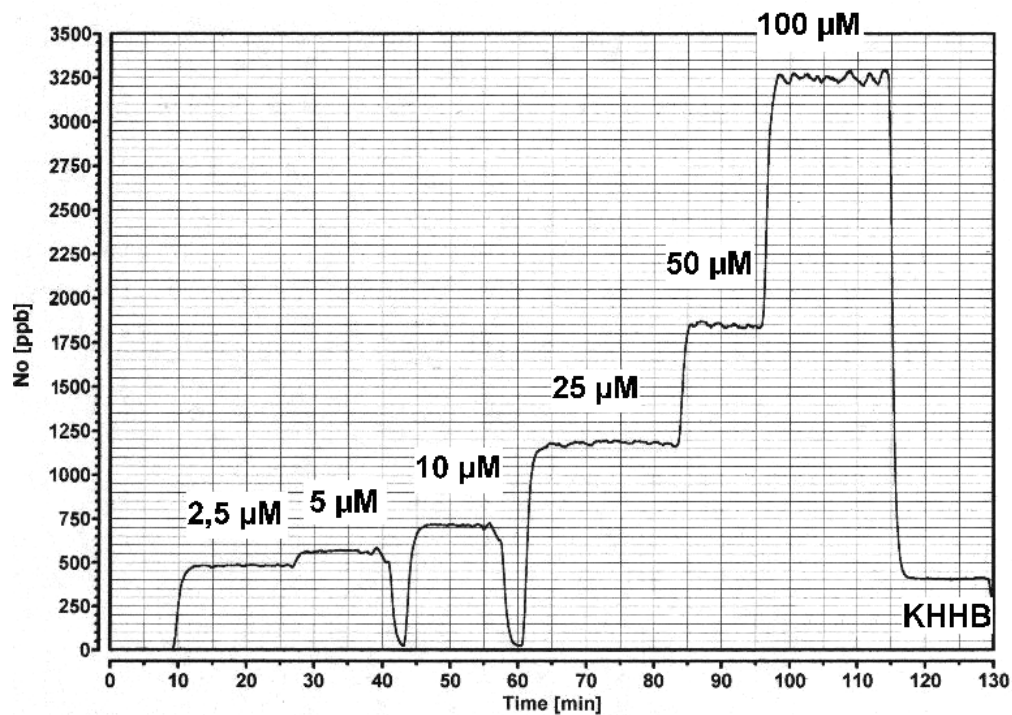
Der andere Schenkel war direkt mit dem Messeingang des Detektors verbunden.

Insgesamt ergab sich bei dieser Messmethode eine zeitliche Verzögerung von 4 Minuten zwischen der Probenentnahme und der NO-Quantifizierung. Diese war bedingt durch den Perfusattransport zur Vanadium(III)Chlorid-Reaktionskammer, der Reaktionszeit und der anschließenden Austreibungszeit zum Chemilumineszenzdetektor.

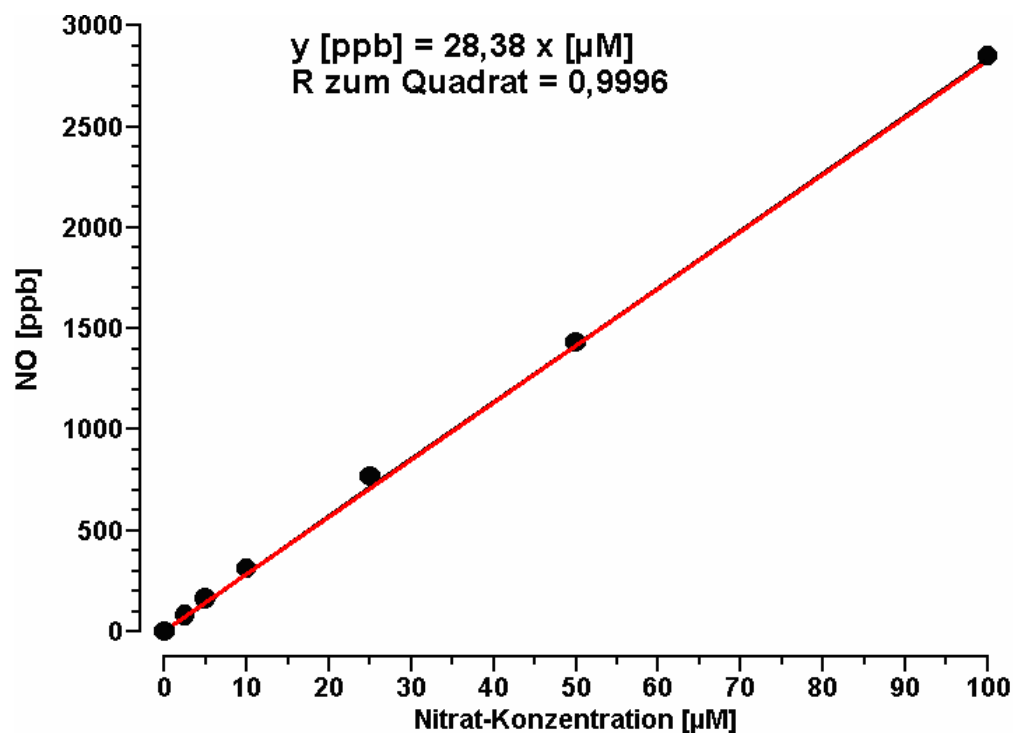
### 3.3.7. Kalibration der Vanadium(III)Chlorid-Reaktionskammer

Die Kalibration der Vanadium(III)Chlorid-Reaktionskammer erfolgte mit Hilfe von Nitratlösungen, die aus einer 1 M Stammlösung hergestellt wurden und jeweils 10 ml einer bekannten Konzentration (2,5, 5, 10, 25, 50 und 100 µM) enthielten. Des Weiteren wurde die NO<sub>x</sub>-Konzentration der Perfusatlösung ermittelt und als Nullwert gesetzt. Ebenfalls enthielt das zur Herstellung und Verdünnung der Kalibrationslösungen verwendete destillierte Wasser geringe Mengen an NO<sub>x</sub>. Aus diesem Grund musste dessen NO<sub>x</sub>-Konzentration bestimmt und von den Werten der Kalibrationslösungen subtrahiert werden.

Zur Kalibration wurden die Probelösungen der Reaktionskammer analog dem Kaninchenlungen-Versuchsaufbau über die Rollerpumpe und das Kapillarsystem zugeführt. Nach einer Verzögerungszeit von 4 Minuten stieg das Signal an und erreichte nach etwa 30 Sekunden ein stabiles Plateau (siehe Abb. 3.7.). Aus diesen Plateauwerten konnte eine Regressionsgerade ( $R = 0,9996 \pm 0,0003$ , siehe Abb. 3.8.) ermittelt werden.



**Abb. 3.7.** Original Eichkurve bei Eichung mit 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 µM Nitratlösungen sowie mit der hydroxyethylstärkehaltigen Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung (KHHB).



**Abb. 3.8.** Regressionsgerade durch die Kalibrationsmesspunkte nach Abzug der ermittelten  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen für die Perfusatlösung und des zur Verdünnung benötigten destillierten Wassers.

Aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus war es notwendig, täglich eine Kalibration der Messanordnung und der jeweils eingestellten Versuchsparameter mit den oben beschriebenen Standard-Nitratkonzentrationen durchzuführen.

### **3.4. Fehlerkorrektur der $\text{NO}_x$ -Analyse unter Verwendung von hydroxyethylstärkehaltigem (HAES) Perfusat am Modell der isolierten Kaninchenlunge**

#### **3.4.1. Problembeschreibung und Begründung zur Einführung einer Fehlerkorrektur**

Zur Analyse der Nitrat-, Nitrit- und Peroxynitritkonzentration ( $\text{NO}_x$ ) wurde dem zirkulierenden Perfusat kontinuierlich ein Volumen von 600  $\mu\text{l}/\text{min}$  entzogen. Aus diesem Grund würde allerdings stetig das Perfusatvolumen abnehmen und bei gleichbleibender  $\text{NO}$ -Produktion der Lunge eine falsch hohe  $\text{NO}_x$ -Konzentration gemessen werden. Um einerseits eine fehlerhafte Dokumentation der  $\text{NO}_x$ -Produktion zu vermeiden und andererseits ein Leerlaufen des Perfusatsystems zu verhindern, wurde über einen Infusomaten (IVAC 531-1, Ivac Infusion Pump Inc.) kontinuierlich exakt die Menge an frischem Perfusat ergänzt, die dem System zur Analyse entzogen wurde. Somit konnte bei konstantem Zu- und Abfluss (=Volumenfluss) ein konstantes, zirkulierendes Perfusatvolumen von 150 ml erzielt werden. Allerdings bedingte dies zum einen eine kontinuierliche Verdünnung der  $\text{NO}_x$ -Konzentration im zirkulierenden Perfusat, zum anderen beinhaltete das zugeführte Perfusat selbst einen gewissen  $\text{NO}_x$ -Anteil (s.u.). Dieser Fehler wurde mit zunehmender Versuchsdauer gravierender.

Um diese Konzentrationsfehler später computergestützt eliminieren zu können, musste also ein Algorithmus gefunden werden, der bei einem konstanten Volumenfluss eine Konzentrationskorrektur zwischen dem gemessenen und dem realen  $\text{NO}_x$ -Wert berechnen konnte.

Bereits zuvor wurden an diesem Arbeitsplatz Versuche mit einer Online-Messung der  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen im Perfusat durchgeführt (GESSLER 1996 [143]). Auch hierbei

entstand ein Verdünnungsfehler, der durch eine später durchgeführte Fehlerkorrektur computergestützt eliminiert werden konnte. Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen eine hydroxyethylstärkefreie Krebs-Henseleit Pufferlösung als Perfusatlösung eingesetzt. Diese hatte den Vorteil, dass sie keinen nennenswerten  $\text{NO}_x$ -Anteil beinhaltete, und man konnte somit bei der anschließend durchgeführten Fehlerberechnung lediglich von einem Verdünnungseffekt ausgehen (siehe hierzu Kapitel 3.4.2.).

Im Gegensatz hierzu wurde bei der vorliegenden Arbeit dem Krebs-Henseleit-Puffer Hydroxyethylstärke zugesetzt, um mit Hilfe dieses Polysaccharids einen physiologischen kolloidosmotischen Druck zu erzeugen. Problematisch an der Krebs-Henseleit-Hydroxyethylstärke-Pufferlösung (KHHB) war jedoch ein gewisser chargenabhängiger  $\text{NO}_x$ -Anteil. Dieser musste als zufließende  $\text{NO}_x$ -Konzentration neben dem Volumenfluss in die Fehlerbetrachtung einbezogen werden.

Zur Vermeidung von Zeitverschiebungen wurden auch während der Ischämie-Periode Daten aufgezeichnet. Allerdings erfolgte während dieser Zeit keine Probenbestimmung, so dass dieses Zeitintervall ebenfalls bei der Programmierung berücksichtigt und herausgerechnet werden musste.

Aus diesen Gründen war die von GESSLER 1996 beschriebene Fehlerkorrektur bei den Versuchen dieser Arbeit nicht mehr anwendbar. Sie diente jedoch als Basis zur Entwicklung einer neuen, modifizierten Fehlerkorrektur.

### 3.4.2. Mathematische Herleitung des verwandten Algorithmus

Ausgangspunkt und Voraussetzung zur Erstellung einer mathematischen Korrekturformel war ein bestehendes Flussgleichgewicht zwischen dem Volumenzufluss (durch neues Perfusat) und dem Volumenabfluss (der Probenmenge) sowie ein konstantes zirkulierendes Perfusatvolumen von 150 ml. Diese Voraussetzungen konnten durch kontrolliertes Zutropfen mit Hilfe eines Infusomaten einerseits und durch den Einsatz einer gleichmäßig laufenden Rollerpumpe andererseits leicht realisiert werden. Weiterhin wurde die  $\text{NO}_x$ -Konzentration des abfließenden Perfusats online gemessen und war ebenfalls zur späteren Berechnung bekannt.

**Erläuterung der Variablen:**

$c(t)$  Reale Konzentration im zirkulierenden System

$c_a(t)$  Konzentration der abfließenden Probenmenge

$c_z(t)$  Konzentration der zufließenden Perfusatmenge

$V_a(t)$  Volumenabfluss

$V_z(t)$  Volumenzufluss

$V_0$  zirkulierendes Ausgangsvolumen

$V$  Menge des zu- und abfließenden Perfusatflusses

Es kann zunächst der allgemeingültige und von GESSLER 1996 für dieses Modell beschriebene Algorithmus zur Berechnung der Konzentration der abfließenden Probenmenge  $c_a(t)$  formuliert werden:

$$c_a(t) = \frac{c(t) \cdot V_0 + \int c_z(t) \cdot V_z(t) \cdot dt - \int c_a(t) \cdot V_a(t) \cdot dt}{V_0 + \int (V_z(t) - V_a(t)) \cdot dt} \quad \text{Gl. 3.3.}$$

Hierbei beschreiben die beiden Integrale im Zähler jeweils die  $\text{NO}_x$ -Konzentration in der zu- bzw. abfließenden Perfusatlösung, das Integral im Nenner die Volumendifferenz zwischen zu- und abgeflossenem Perfusat.

Mit den Bedingungen, dass die zu- und abfließenden Volumina konstant bleiben (die Einstellungen am Infusiomaten und der Rollerpumpe also nicht verändert werden) konnte  $V_z(t) = V_z$ ,  $V_a(t) = V_a$  gesetzt werden und es ergab sich folgende Formel:

$$c_a(t) = \frac{c(t) \cdot V_0 + V_z \int c_z(t) \cdot dt - V_a \int c_a(t) \cdot dt}{V_0 + (V_z - V_a) \cdot t} \quad \text{Gl. 3.4.}$$

Hier konnte GESSLER, der  $\text{NO}_x$ -freies KHB-Perfusat verwandte, eine entscheidende Vereinfachung des Terms vornehmen, die bei Gebrauch von KHHB nicht zulässig



war: Er konnte die Konzentration des Zuflusses gleich Null setzen und somit  $c_z$  eliminieren.

Bei Einsatz des HAES-haltigen KHHB Perfusats war  $c_z = \text{konstant}$  aber nicht Null!

Da allerdings die  $\text{NO}_x$ -Konzentration sowie die Menge des Zuflusses vor oder nach jedem Versuch ohne großen Aufwand bestimmt werden konnte, ist eine Umformung von Gleichung 3.4. zu 3.5. möglich:

$$c_a(t) = \frac{c(t) \cdot V_0 + \dot{V}_z \cdot c_z \cdot t - \dot{V}_a \int c_a(t) \cdot dt}{V_0 + (\dot{V}_z - \dot{V}_a) \cdot t} \quad \text{Gl. 3.5.}$$

Wie oben beschrieben, ist das Volumen des Zuflusses gleich dem des Abflusses ( $\dot{V}_z = \dot{V}_a$ ) und es entsteht folgende Gleichung:

$$c_a(t) = \frac{c(t) \cdot V_0 + \dot{V}_z \cdot c_z \cdot t - \dot{V}_a \int c_a(t) \cdot dt}{V_0} \quad \text{Gl. 3.6.}$$

Nach Umformung erhält man:

$$c_a(t) = c(t) + \frac{\dot{V}_z}{V_0} \cdot c_z \cdot t - \frac{\dot{V}_a}{V_0} \int c_a(t) \cdot dt \quad \text{Gl. 3.7.}$$

Wie schon erwähnt war  $\dot{V}_z = \dot{V}_a$ , der Fluss entsprach dabei dem Volumenfluss  $\dot{V}$ .

Ersetzt man dies in Gleichung 3.7., so stellt sich die Formel wie unten gezeigt dar:

$$c_a(t) = c(t) + \frac{\dot{V}}{V_0} \cdot \left[ c_z \cdot t - \int c_a(t) \cdot dt \right] \quad \text{Gl. 3.8.}$$

Die Auflösung der Gleichung 3.8. nach  $c(t)$  erbringt zur Fehlerberechnung folgenden Algorithmus:

$$c(t) = c_a(t) - \frac{V_z}{V_0} \cdot \left[ c_z \cdot t - \int c_a(t) \cdot dt \right] \quad \text{Gl. 3.9.}$$

Da das Erfassungsprogramm die Daten mit einer Frequenz von 1 Hz aufzeichnete, konnte die Gleichung 3.9. nach Transformation der stetigen Variable  $t$  in die diskrete Variable  $k \cdot T_0$  ( $T_0$  stellte die Zeitdauer der Aufzeichnung (1 Sekunde) und  $k$  die Anzahl der Intervalle 1, 2, 3, ...) folgendermaßen zur Programmierung umformuliert werden:

$$c(k \cdot T_0) = c_a(k \cdot T_0) - \frac{V_z}{V_0} \left( c_z \cdot k \cdot T_0 - \sum_{v=0}^{k-1} T_0 \cdot c_a(v) \right) \quad \text{Gl. 3.10.}$$

Die Umstellung von Gleichung 3.10. ergibt den hier letztlich angewandten Algorithmus:

$$c(k \cdot T_0) = c_a(k \cdot T_0) + \frac{V_z}{V_0} \sum_{v=0}^{k-1} T_0 \cdot c_a(v) - \frac{V_z}{V_0} (c_z \cdot k \cdot T_0) \quad \text{Gl. 3.11.}$$

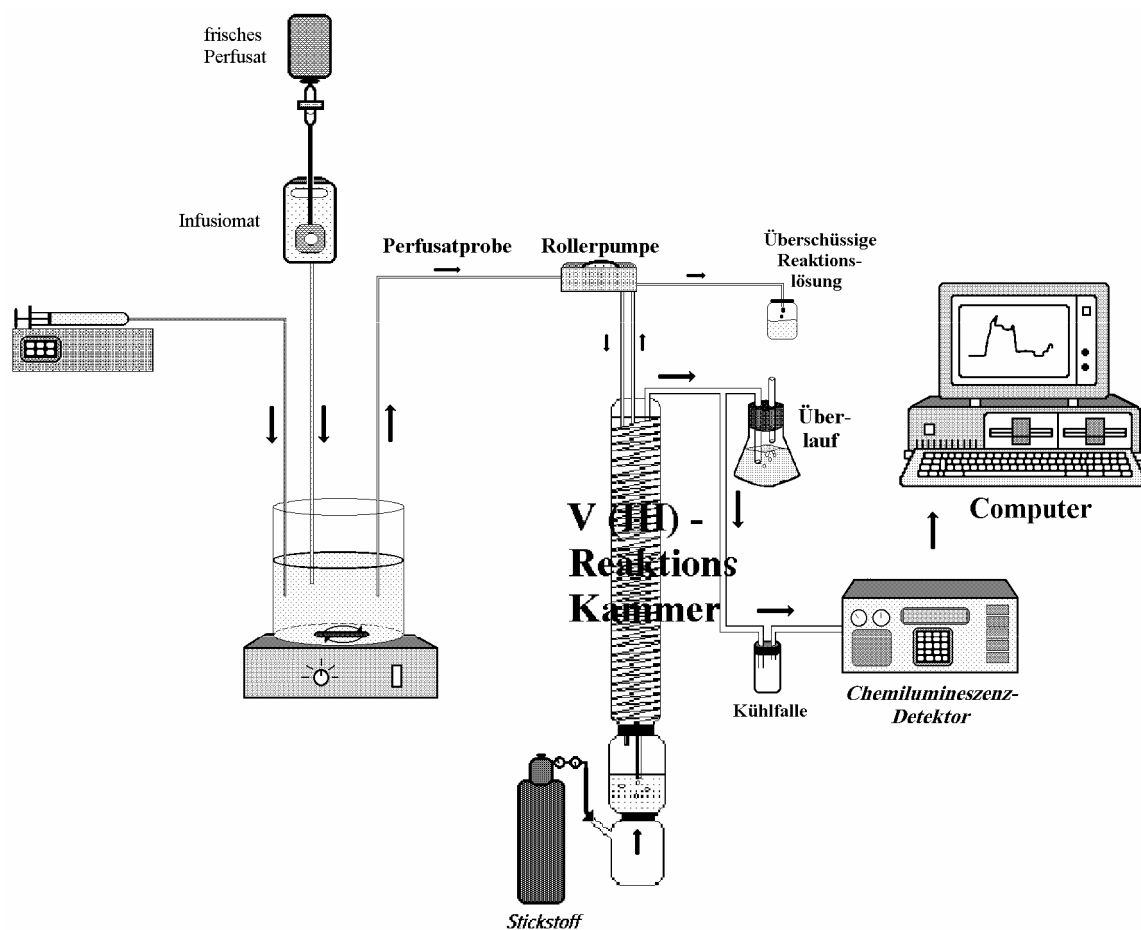
Die Berechnung des Verdünnungs- und Konzentrationsfehlers erfolgte nach Programmierung eines auf der Gleichung 3.11. basierenden Algorithmus in Turbo Pascal™ (Borland International).

Bei Programmstart mussten die  $\text{NO}_x$ -Konzentration des Perfusats, der Volumenfluss, die Anfangs- und Endpunkte des zu korrigierenden Abschnitts und die Länge der Ischämieperiode eingegeben werden. Nach Eingabe dieser variablen Parameter erhielt man die Werte der realen  $\text{NO}_x$ -Konzentration und konnte diese zur weiteren Auswertung nutzen.

### 3.4.3. Validitätskontrolle der erstellten Fehlerkorrektur

Zur Validitätskontrolle des angewandten Algorithmus (Gl. 3.11.) wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der in Bezug auf die  $\text{NO}_x$ -Analyse des Perfusats dem Modell der isolierten Kaninchenlunge glich.

Stellvertretend für die NO-Produktion der Kaninchenlunge wurde hier ein Perfusor (Injectomat S, Fresenius) eingesetzt, der kontinuierlich eine Nitratlösung bekannter Konzentrationen ( $0,1 \mu\text{l/min}$  oder  $0,2 \mu\text{l/min}$ ) in ein Becherglas (Kalensee) mit einem Perfusatvolumen von 150 ml pumpt (siehe Abb. 3.9.). Ein Magnetrührer (IKAMAR<sup>®</sup> REO, Jahke & Kunkel) sorgte für eine gleichmäßige Verteilung der zugeführten Nitratlösung.



**Abb. 3.9.** Versuchsaufbau zur Validitätsprüfung der entwickelten Fehlerkorrektur.

Zur Analytik des Perfusats wurde analog zum experimentellen Aufbau der isolierten Kaninchenlunge die Rollerpumpe (ISMATEC IP 12, Ismatec), die Vanadium(III)Chlorid-Säule und der Chemilumineszenzdetektor (UPK 3100, UPM) eingesetzt. Um auch in dieser Versuchsanordnung ein „Leerlaufen“ des Systems zu verhindern, musste wie im isolierten Lungenmodell frisches Perfusat kontrolliert zuge tropft (IVAC 531-1, Ivac Infusion Pump) werden.

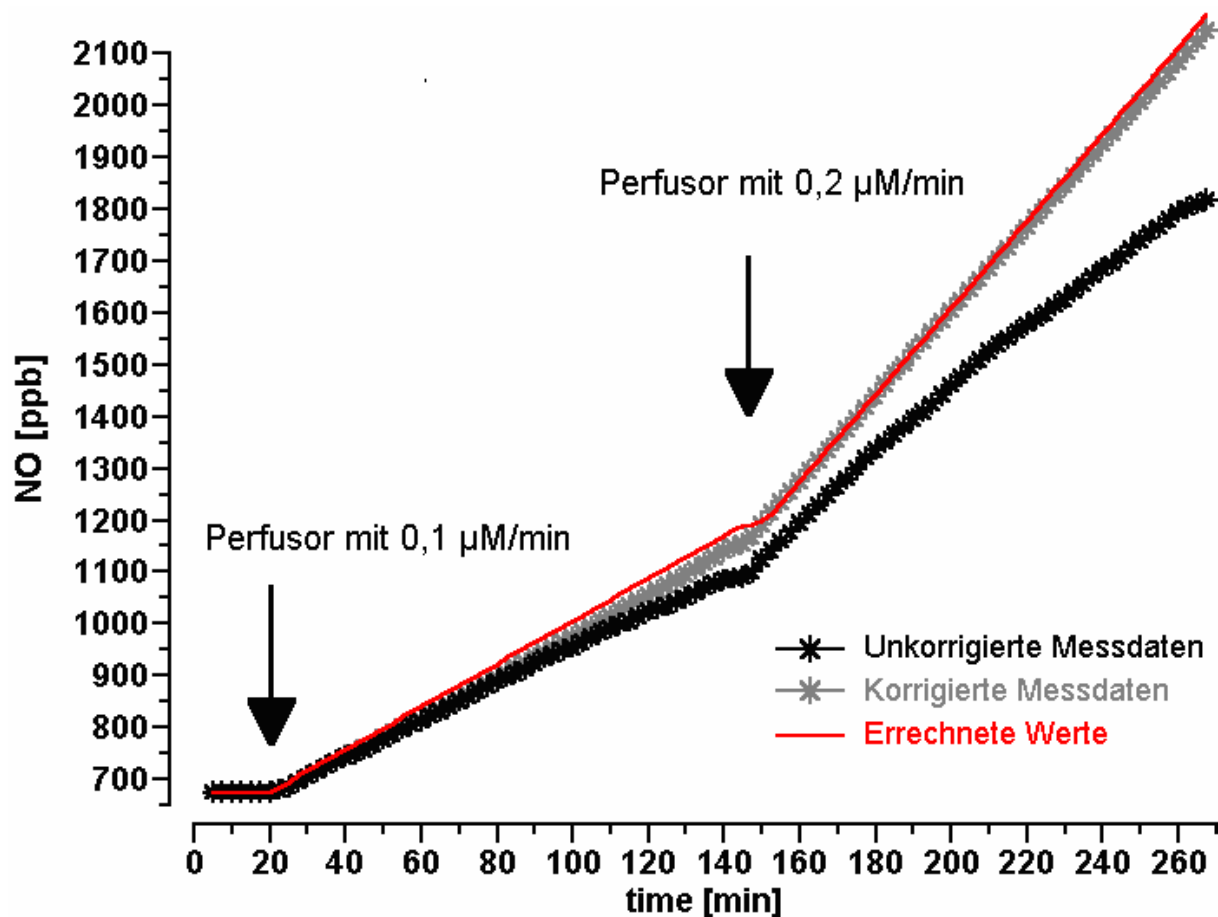
Der Vorteil dieser Versuchsanordnung bestand darin, dass die im Becherglas real erreichte Konzentration in  $\mu\text{M}$  errechnet und in ppb angegeben werden konnte. Gleichzeitig konnte experimentell mit Hilfe der Vanadium(III)Chlorid-Säule die NO-Konzentration in ppb bestimmt werden. Die anschließend durchgeführte computergestützte Fehlerkorrektur (siehe Kapitel 3.4.2.) gab ebenfalls die korrigierten Werte in ppb aus.

Somit konnten diese Ergebnisse ohne Einschränkungen miteinander verglichen werden. Es ergaben sich folgende Befunde:

Die korrigierten Messwerte erreichten beim Einsatz eines Perfusors der Leistung 0,1  $\mu\text{M}/\text{min}$  Nitratlösung nach 115 Minuten Laufzeit  $98,56 \pm 1,0\%$  ( $\pm\text{S.E.M.}$ ) der errechneten Werte. Ohne Korrektur ergaben die Messwerte nur  $83,3 \pm 0,05\%$  ( $\pm\text{S.E.M.}$ ) der errechneten Werte und wiesen somit deutlich zu niedrige Messergebnisse aus.

Bei Verwendung eines Perfusors der doppelten Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}/\text{min}$  Nitratlösung errechnete die Korrektur nach 115 Minuten Versuchszeit  $97,62 \pm 2,5\%$  ( $\pm\text{S.E.M.}$ ) des kalkulierten Werts. Auch hierbei stellten sich die Messwerte ohne Korrektur mit  $74,68 \pm 1,8\%$  ( $\pm\text{S.E.M.}$ ) als erheblich zu niedrig dar. Insgesamt wurden hierzu vier Kontrollversuche durchgeführt.

Zur Illustration der Bedeutung und Auswirkung der durchgeführten Korrektur sind in Abb. 3.10. am Beispiel eines Experiments mit zwei unterschiedlichen Perfusorkonzentrationen (0,1 und 0,2  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) die Rohmessdaten, die korrigierten und die errechneten Messwerte gegeneinander aufgetragen.



**Abb. 3.10.** Grafischer Vergleich zwischen gemessenen, korrigierten und errechneten Messdaten anhand eines Kontrollversuchs.

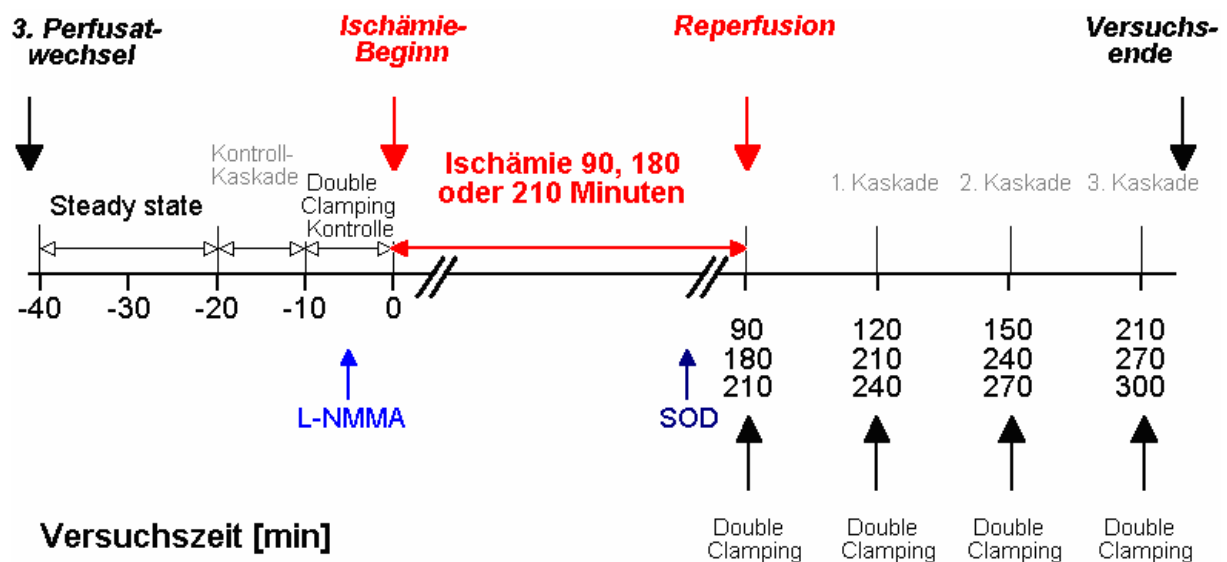
### 3.5. Experimentelles Protokoll

Jede Kaninchenlunge wurde zunächst mit einem Mischgas bestehend aus 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub> beatmet und absolvierte eine 20-minütige steady-state Phase. Hierbei musste sie einen stabilen pulmonal-arteriellen Druck (PAP), linksventrikulären Druck (LVP) sowie Beatmungsdruck (VP), sowie ein konstantes Organgewicht aufweisen. Weiterhin musste sich das exhalative NO auf ein Plateauniveau einstellen und die NO<sub>x</sub>-Konzentration im Perfusat gleichmäßig akkumulieren.

Anschließend wurden die Kaninchenlungen einer definierten hydrostatischen Druckbelastung unterzogen. Bei diesem Vorgang durften ein maximaler kapillärer Filtrations-Koeffizient (K<sub>fc</sub>) von 1,4 cm<sup>3</sup>/s x cmH<sub>2</sub>O x g10<sup>4</sup> und eine Retention von maximal 2 g nicht überschritten werden (siehe Kap. 3.2.3.). Die Nichteinhaltung dieser Rahmenparameter wurde als Ausschlusskriterium angesehen.

Zur Bestimmung des mikrovaskulären Drucks wurde in den folgenden 10 Minuten viermal ein „Double-Clamping“-Manöver durchgeführt (siehe Kap. 3.2.2.).

Die Ischämiezeit begann mit dem Perfusionsstopp und die Versuchszeit wurde auf „Null“ gesetzt (siehe Abb. 3.11.).



### Abb. 3.11. Schematischer Versuchsverlauf

Auch während der Ischämieperiode wurden die Lungen kontinuierlich mit temperierten, wasserdampfgesättigten Gasgemischen unterschiedlicher Zusammensetzung (s.u.) ventiliert.

**a.) Versuchsreihen mit einer 180- bzw. 210-minütigen Ischämieperiode:**

Die Versuchsreihen mit einer Ischämiezeit von 180 bzw. 210 Minuten wurde mit einer vasalen Distension durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde unmittelbar zu Ischämiebeginn der intravaskuläre Druck auf 6 mmHg eingestellt und zeitgleich der arterielle und venöse Katheter mit Klemmen verschlossen. Auf diese Weise wurde während der gesamten Ischämieperiode ein positiver intravasaler Druck aufrechterhalten.

**Im Einzelnen wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt:**

- $\text{FeO}_2=0,21$

Die Lungen wurden während der Ischämieperiode mit einem Gasgemisch bestehend aus 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub> beatmet.

- **FiO<sub>2</sub>=0,21 + L-NMMA**

Bei den Versuchen dieser Versuchsreihe wurden die Lungen während der Ischämieperiode mit 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub> ventiliert. Zusätzlich wurde dem zirkulierenden Perfusat 5 Minuten vor Ischämiebeginn der NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA (400 µM) zugesetzt.

- **FiO<sub>2</sub>=0**

Die Kaninchenlungen wurden während der Ischämie mit einem anoxischen Gasgemisch bestehend aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub> beatmet. Unmittelbar vor der Reperfusion wurde wieder zu einem normoxischen Atemgas (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub>) gewechselt.

- **FiO<sub>2</sub>=0 + L-NMMA**

Analog den normoxischen Versuchen FiO<sub>2</sub>=0,21 + L-NMMA wurde auch bei der anoxischen Versuchsreihe der NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA (400 µM) eingesetzt und 5 Minuten vor Ischämiebeginn dem zirkulierenden Perfusat zugegeben. Die Kaninchenlungen wurden zur Ischämiezeit mit einem anoxischen Gasgemisch bestehend aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub> ventiliert. Unmittelbar vor Reperfusion wurde die Beatmung wieder auf 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub> zurückgestellt.

- **FiO<sub>2</sub>=0 + SOD mit 210-minütiger Ischämie**

Während einer anoxischen Ischämieperiode von 210 Minuten wurden die isolierten Kaninchenlungen mit einem sauerstofffreien Mischgas, bestehend aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub>, beatmet. Unmittelbar vor Reperfusion wurde das Gasgemisch auf ein normoxisches Atemgas (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub>) umgestellt und mit der Reperfusion 100 U/ml SOD appliziert.

## **b.) Versuchsreihe mit einer 90-minütigen Ischämieperiode**

- **FiO<sub>2</sub>=0 und fehlende vasale Distension**

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Protokollen wurde bei den Versuchen dieser Reihe der intravasale Druck zu Ischämiebeginn auf 0 mmHg eingestellt. Die 90-minütige Ischämieperiode erfolgte unter anoxischer Ventilation mit einem Mischgas von 5% CO<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub>. Unmittelbar vor der Reperfusion wurde das Atemgas wieder auf 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub> gewechselt.

### **c.) Kontrollversuche**

Die Lungen wurden ohne Unterbrechung oder weitere Interventionen perfundiert und normoxisch mit einem Mischgas der Zusammensetzung 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub> ventiliert. Die K<sub>fc</sub>-Werte und die mikrovaskulären Drücke wurden zu den korrespondierenden Zeitpunkten der Ischämieversuche bestimmt.

### **Reperfusion**

Am Ischämieende erfolgte die kontrollierte Reperfusion. Hierzu wurde innerhalb von 3 Minuten der Perfusionsfluss stufenweise von initial 10 ml/min auf das Ausgangsniveau von 100 ml/min angehoben.

30, 60 und 90 Minuten nach Reperfusion erfolgten Kaskadenmanöver und nach 3, 30, 60 und 90 Minuten wurden die mikrovaskulären Drücke bestimmt (siehe hierzu Abb. 3.11.).

### **Versuchsende/-abbruch**

Alle Experimente wurden regulär 100 Minuten nach Reperfusion beendet. Vorzeitig abgebrochen wurden sie, wenn ein massives Ödem eintrat.

## **3.6. Statistik**

Die erhobenen Daten der vorgestellten Versuche wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (S.E.M. = Standard Error of the Mean) dargestellt. Die Unterschiede in den Versuchsreihen mit einer Ischämieperiode von 210 Minuten wurden mit Hilfe einer einseitigen Varianzanalyse nach dem post hoc Student-Newman-Keuls Test untersucht. Unterschiede mit p-Werten kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.



## 4. Ergebnisse

Die in dieser Dissertationsarbeit präsentierten Ergebnisse basieren auf der Auswertung von insgesamt 59 Versuchen an isolierten Kaninchenlungen.

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen erfolgten zunächst Vorversuche mit Ischämieperioden zwischen 150 und 240 Minuten Länge zur Ermittlung einer optimalen Ischämiezeit im aktuellen Modell. Als Basis dienten hier die bereits von SCHÜTTE et al. 1998 [119] und HERMLE et al. 1999 [16] durchgeführten Ischämie- und Reperfusionsversuche. Die eigenen Vorversuche sowie die von Hermle und Schütte bereits publizierten Untersuchungen an vergleichbaren Versuchsaufbauten werden in dieser Arbeit im Einzelnen nicht vorgestellt.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen werden im Anschluss in Anlehnung an die Gliederung des experimentellen Protokolls (Kap. 3.5) präsentiert.

Im Kapitel 4.1. werden zunächst die Ergebnisse der Ischämie-/ Reperfusionsversuche mit einer Ischämieperiode von 180 und 210 Minuten Länge unter den Bedingungen einer vasalen Distension vorgestellt. Zunächst wurden 18 Versuche mit einer Ischämieperiode von 180 Minuten durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse ließen sich nach Verlängerung der Ischämiezeit auf 210 Minuten noch besser akzentuieren und ergaben qualitativ gleichartige Aussagen. Aus diesem Grund werden diese Ergebnisse jeweils im gemeinsamen Zusammenhang vorgestellt.

Im Kapitel 4.2. wird die Versuchsreihe 90 Minuten anoxisch ventilierte Ischämie mit kollabierten Gefäßen dargestellt. Diese kürzere Ischämieperiode konnte einen den 210-minütigen Ischämieversuchen bei vasaler Distension vergleichbaren Schaden erzielen. In vergleichbaren Ischämieexperimenten zeigte SCHÜTTE bereits 1998 [119], dass sich der Ischämie-/ Reperfusionsschaden durch die Aufrechterhaltung eines positiven intravasalen Drucks deutlich reduzieren ließ. In Ergänzung zu diesen Versuchsreihen sollte hier geklärt werden, ob sich grundsätzliche Unterschiede am Verhalten der NO-Produktion während einer anoxischen Ischämie mit fehlender vasaler Distension im Vergleich zu Versuchen mit vasaler Distension zeigten.

Da insbesondere das Verhalten der NO-Liberation während und im Anschluss an eine Ischämieperiode im Vordergrund dieser Arbeit stand, werden diese Messergebnisse jeweils zuerst betrachtet.

#### **4.1. Ergebnisse der Versuchsreihen mit 180- und 210-minütiger Ischämieperiode unter den Bedingungen der vasalen Distension**

##### **4.1.1. Ergebnisse der Stickstoffmonoxid (NO)-Analyse im exhalativen Atemgas vor, während und nach der Ischämieperiode**

Der exhalative Stickstoffmonoxid (NO) – Anteil wurde in allen Versuchsgruppen während der gesamten Versuchszeit kontinuierlich gemessen und in parts per billion (ppb) bestimmt (siehe Kap. 3.3.4.).

Die nicht-ischämischen Kontrollversuche (control) zeigten hierbei eine anhaltende NO-Emission. Zu Versuchsbeginn lagen die Messwerte in allen Versuchsreihen übereinstimmend im Bereich von 47 - 52 ppb NO. Im weiteren Versuchsverlauf fiel der emittierte NO-Anteil in der Kontrollgruppe kontinuierlich bis auf Werte um 30 ppb nach 280 Minuten und auf etwa 25 ppb NO-Gehalt nach 320 Minuten Versuchsdauer (siehe Abb. 4.1. und Abb. 4.2.).

Betrachtet man die Versuchsreihen mit einer Ischämieperiode unter normoxischer Beatmung ( $FiO_2 = 0,21$ ), so zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein milder Abfall der NO-Produktion während der Ischämie. Im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte sich der exhalative NO-Anteil um rund 15 ppb bei weiterhin kontinuierlicher Exhalation. Mit der Reperfusion stieg die exhalierete NO-Konzentration wieder unmittelbar an und nach einer kurzen überschießenden NO-Produktion wurden Messwerte protokolliert, die den Kontrollgruppen ohne Ischämie entsprachen.

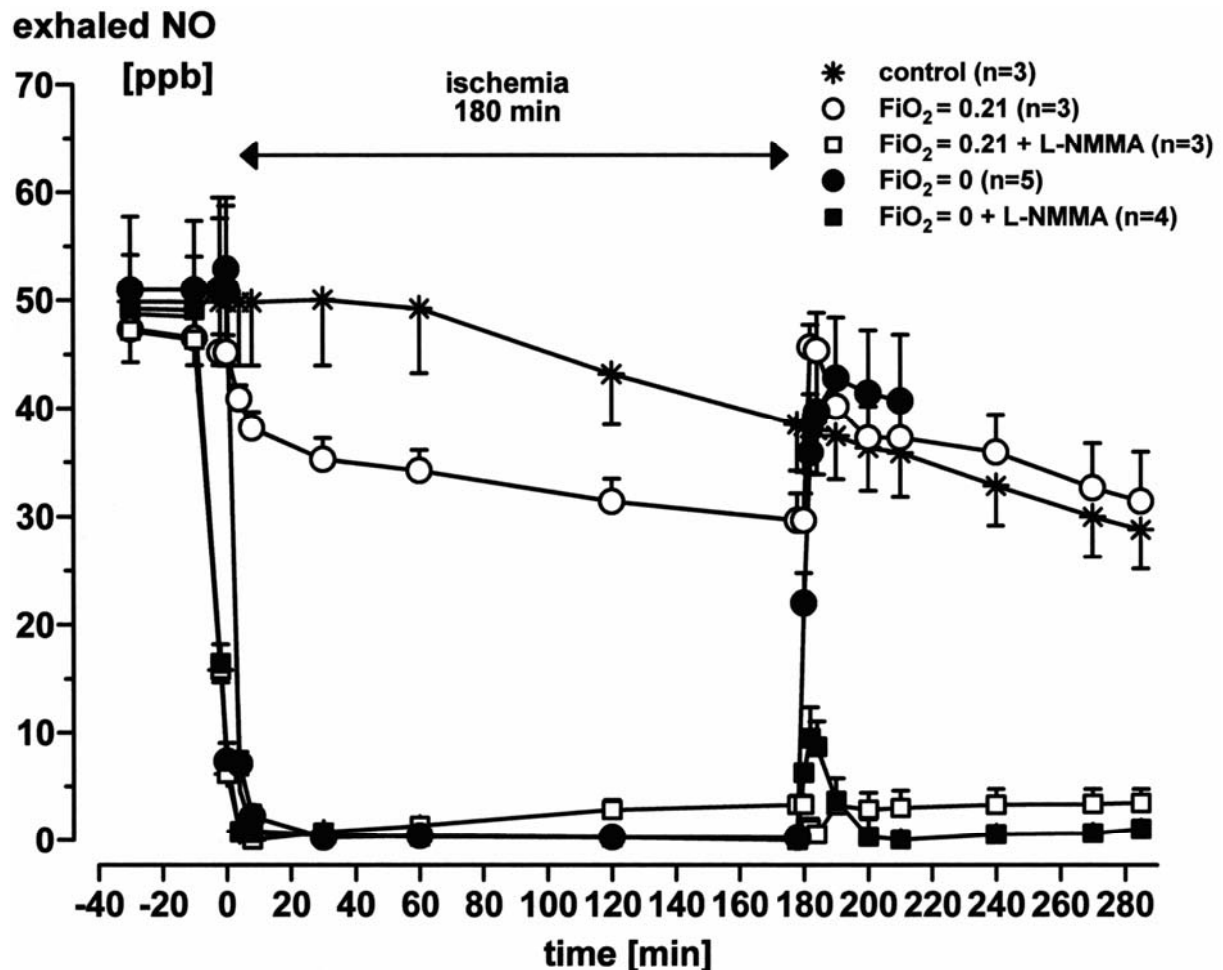
Die Versuchsreihen mit einer anoxisch ventilierten Ischämie ( $FiO_2 = 0$ ; 180 Minuten bzw. 210 Minuten) wiesen einen unmittelbaren Abfall des NO-Signals nach dem Wechsel des Beatmungsgases zum sauerstofffreien Gasgemisch zu Ischämiebeginn auf. Es kam während dieser Phase zum fast vollständigen Versiegen der NO-Produktion. Nach dem erneuten Wechsel des Beatmungsgases zu Ischämieende zurück auf ein normoxisches Gasgemisch kam es zum sofortigen Wiedereinsetzen der NO-Freisetzung. Vergleichbar zu den Versuchsreihen mit einer normoxischen Ischämie zeigte sich auch hier zunächst eine überschießende NO-Konzentration im Exhalat. Diese pendelte sich jedoch in der unmittelbaren Folge wieder in etwa auf das Niveau der Kontrollgruppen ein.

Somit konnte aufgezeigt werden, dass eine Unterbrechung der Perfusion per se zu einer reversiblen Minderung der NO-Exhalation führte. Bei vollständiger Abwesenheit von Sauerstoff im Atemgas kam es zum annähernd vollständigen Erlöschen der NO-Produktion während der Ischämieperiode. Nach Reperfusion setzte die NO-Exhalation sofort wieder ein und erschien weder durch eine oxische noch durch eine anoxische Ischämieperiode nachhaltig beeinflusst. Ein qualitativer Unterschied in den Aussagen war auch bei Variation der Ischämiedauer (180 und 210 Minuten) nicht zu erkennen.

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Suppression der endogenen NO-Produktion auf den Reperfusionsschaden wurde der unspezifische NO-Synthase-Hemmer L-NMMA eingesetzt. Die Applikation in einer Dosierung von 400  $\mu$ M 5 Minuten vor Ischämiebeginn führte zum prompten, nachhaltigen und nahezu kompletten Versiegen der NO-Exhalation. Dieser Effekt wurde unabhängig vom verwandten Beatmungsgas ( $FiO_2 = 0,21 + \text{L-NMMA}$  und  $FiO_2 = 0 + \text{L-NMMA}$ ) oder der durchgeführten Ischämieperiode (180 bzw. 210 Minuten) beobachtet. Auch nach Beendigung der Ischämieperiode kam es nicht zum Wiedereinsetzen der NO-Produktion. Offensichtlich spielte die Länge der durchgeführten Ischämie auch in diesem Zusammenhang keine entscheidende Rolle, da sich die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Ischämieintervalle ähnlich darstellten.

Die Applikation von SOD (100 U/ml) zur Reperfusion nach einer anoxisch ventilierten Ischämieperiode zeigte keinen nennenswerten Einfluss auf die verzeichnete NO-Exhalation. Die erhobenen Messwerte entsprachen nach Reperfusion denen der anoxischen ( $FiO_2 = 0$ ) und oxischen ( $FiO_2 = 0,21$ ) Versuchsreihen. Nach einer kurzen Episode der überschießenden NO-Freisetzung näherten sich auch hierbei die Messergebnisse denen der Kontrollgruppen (control) an.

Während der Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ( $K_{fc}$ ) und der hierzu applizierten venösen Druckbelastung kam es in allen Versuchsgruppen zu einem vorübergehenden und vollständig reversiblen NO-Anstieg von 5 ppb. Ausgenommen hiervon waren die Versuchsreihen mit inhibierter NO-Synthase (400  $\mu$ M L-NMMA), die keinen NO-Anstieg zeigten. Zur Vermeidung einer Datenüberladung in den dargestellten Abbildungen wurden diese Messwerte in den dargestellten Graphiken nicht berücksichtigt.



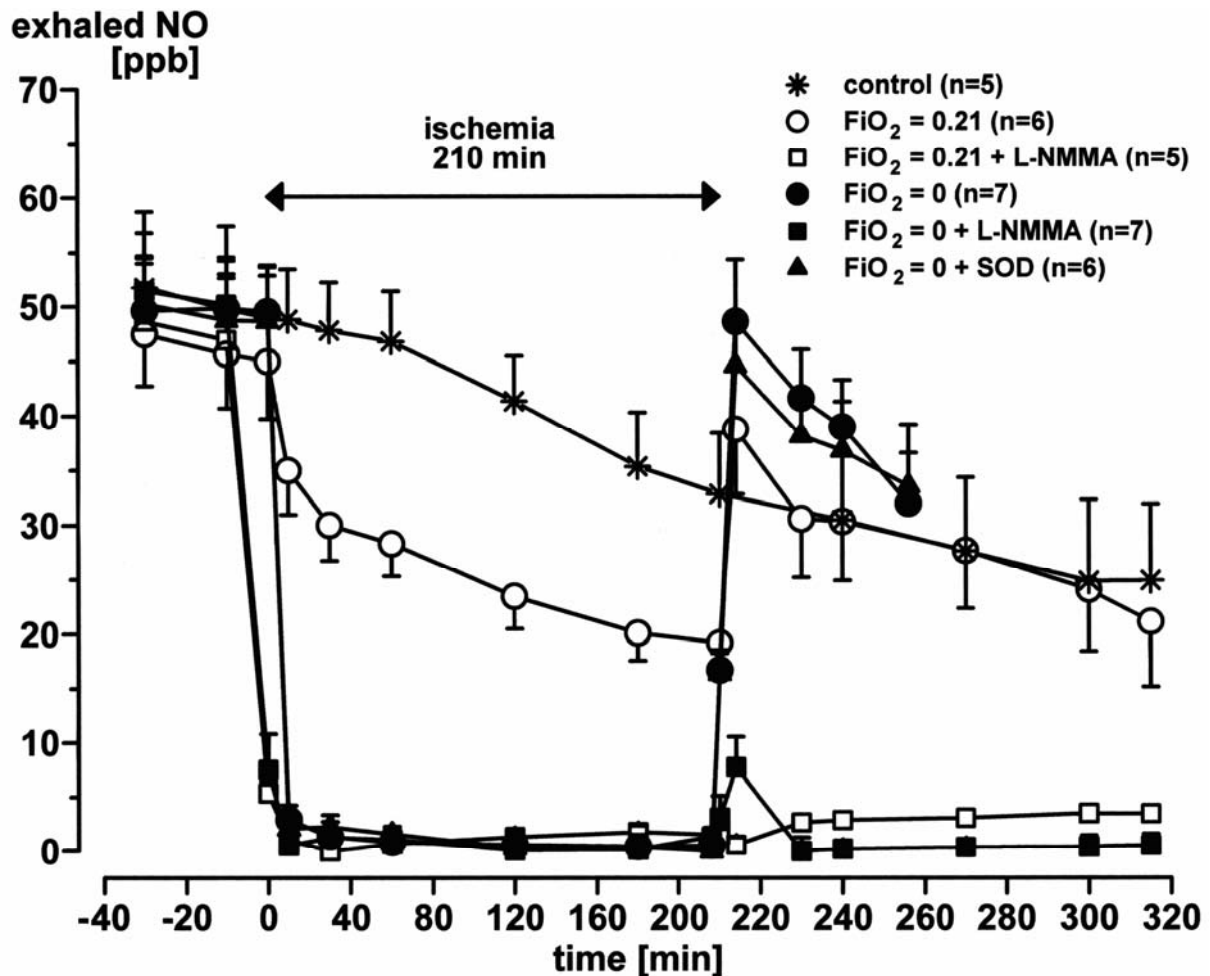
**Abb. 4.1.** Exhalative NO-Emission während der Versuchsreihen mit 180-minütiger Ischämie sowie der entsprechenden Kontrollversuche.

Dargestellt in der Abb. 4.1. sind die exhalative NO-Emission der untersuchten Kaninchenlungen, der Einfluss der Anwesenheit von Sauerstoff sowie die Auswirkungen einer Blockade der NO-Synthase durch L-NMMA während der Ischämiephase. Die Messung erfolgte kontinuierlich während der gesamten Versuchszeit und die NO-Konzentration wurde in parts per billion (ppb) bestimmt.

Nach einer normoxischen Ventilation und gleichmäßiger Perfusion zu Versuchsbeginn begann zum Versuchszeitpunkt  $t=0$  eine 180-minütige Ischämieperiode mit normoxischer oder anoxischer Beatmung. In den Versuchen mit L-NMMA (400  $\mu\text{M}$ ) wurde dieses 5 Minuten vor Ischämiebeginn dem Perfusat beigemischt.

Die Kontrollgruppe wurde kontinuierlich perfundiert und normoxisch ventiliert.

Die Messwerte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Fehlerbalken sind nicht dargestellt, wenn sie in das entsprechende Symbol fielen.  $n$  bezieht die Anzahl der Versuche pro Versuchsreihe.



**Abb. 4.2.** Kurvenverläufe der expiratorischen NO-Freisetzung während der Versuchsreihen mit 210 Minuten Ischämie sowie der entsprechenden Kontrollversuche.

Die Abb. 4.2. präsentiert die NO-Exhalation in den Versuchsreihen mit 210 Minuten Ischämiezeit. Die Messung erfolgte kontinuierlich und während der gesamten Versuchszeit. Die Ergebnisse sind in parts per billion (ppb) angegeben.

Zu Versuchsbeginn wurden die Lungen in allen Versuchsreihen kontinuierlich perfundiert und mit einem sauerstoffhaltigen Gasgemisch beatmet. Zum Versuchszeitpunkt  $t=0$  begann die Ischämieperiode, die entweder unter oxischer oder anoxischer Beatmung, mit oder ohne L-NMMA bzw. SOD verlief. L-NMMA (400  $\mu$ M) wurde 5 Minuten vor Perfusionsstopp dem zirkulierenden Perfusat zugegeben, SOD (100 U/ml) unmittelbar zur Reperfusion. In der Kontrollgruppe erfolgte ohne Intervention die gleichförmige Perfusion und oxische Ventilation.

Die Messwerte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Fehlerbalken sind nicht dargestellt, wenn sie in das entsprechende Symbol fielen.  $n$  bezieht die Anzahl der Versuche pro Versuchsreihe.

#### 4.1.2. Messergebnisse der intravasalen $\text{NO}_x$ -Analyse vor und nach der Ischämieperiode

Die fortwährend ins rezirkulierende Perfusat sezernierte  $\text{NO}_x$ -Menge (Summe von NO und den oxidativen Abbauprodukten) wurde mit Hilfe der Vanadium(III)Chlorid-Säule (siehe Kap. 3.3.6.) vor Beginn und nach Beendigung der Ischämieperiode in allen Versuchsreihen kontinuierlich bestimmt. Nach Versuchsende wurden unter Einsatz einer computergestützten Fehlerkorrektur (siehe Kap. 3.4.) die entsprechenden  $\text{NO}_x$ -Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  berechnet. Eine Probenentnahme während der Ischämieperiode konnte aufgrund der dann unterbrochenen Organperfusion nicht durchgeführt werden. Die Kumulativergebnisse dieses Intervalls werden in Kap. 4.1.3. dargestellt.

Um die Veränderungen der  $\text{NO}_x$ -Freisetzung graphisch besser aufzeigen zu können, werden die Messergebnisse als Differenzwerte pro 10 Minuten ( $\mu\text{M}/10\text{min}$ ) in Anlehnung an frühere Veröffentlichungen (z.B. SPRIESTERS-BACH et al. [142]) präsentiert (siehe Abb. 4.3. und Abb. 4.4.).

Zu Versuchsbeginn wurden die Kaninchenlungen normoxisch ventiliert und gleichmäßig perfundiert. Alle Versuchsreihen zeigten in dieser steady-state-Phase eine vergleichbare kontinuierliche intravasale  $\text{NO}_x$ -Produktion von ca.  $0,7 \mu\text{M}/10\text{min}$ .

Die Kontrollgruppen (control) wurden ohne eine Ischämiephase bis zu 320 Minuten kontinuierlich perfundiert und ventiliert. Sie zeigten während des gesamten Beobachtungszeitraums eine anhaltende und gleichmäßige  $\text{NO}_x$ -Produktion.

Versuche mit einer normoxischen Ischämieperiode ( $\text{FiO}_2 = 0,21$ ) zeigten unabhängig von der Ischämie-länge (180 sowie 210 Minuten) nach Reperfusion eine kurz anhaltende, überschießende  $\text{NO}_x$ -Produktion, bevor sie sich wieder auf dem Niveau der Kontrollgruppen einpendelten.

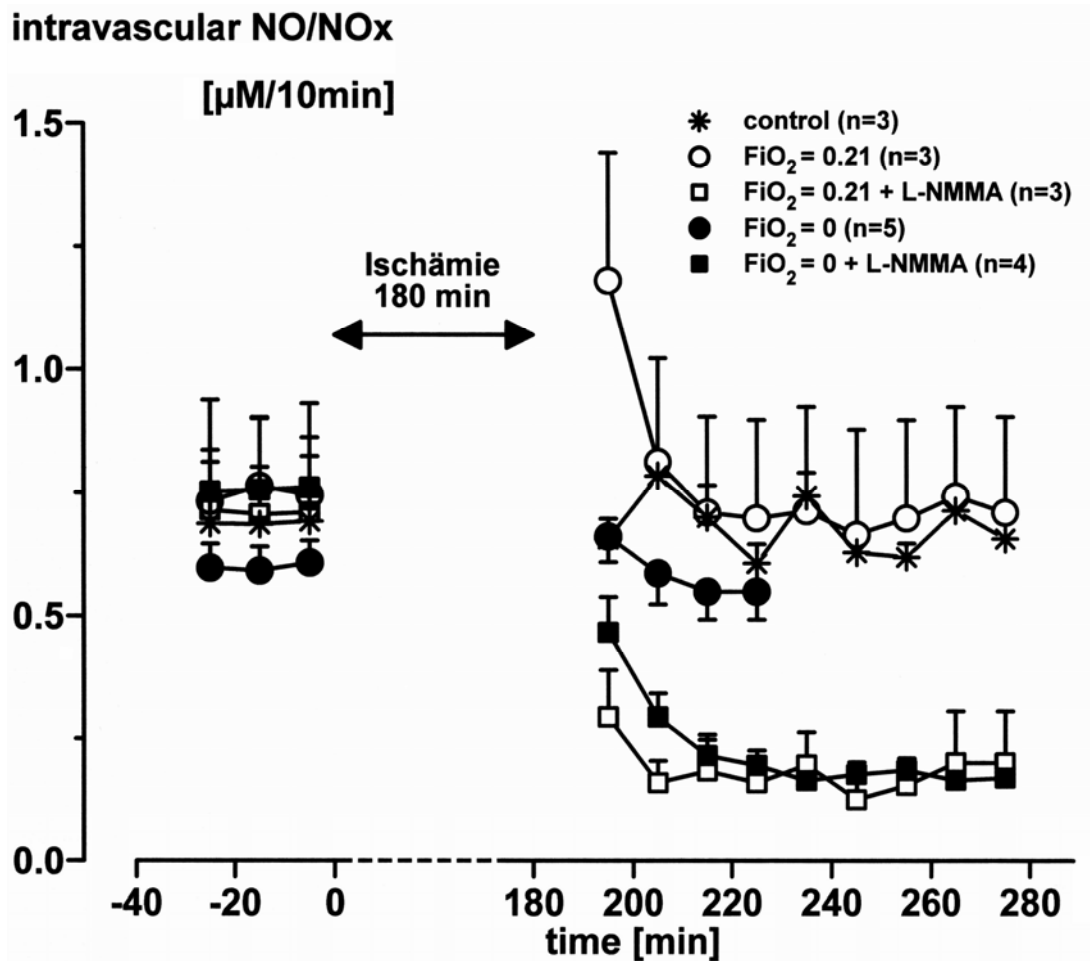
Nach einer anoxisch ventilierten Ischämie ( $\text{FiO}_2 = 0$ ) von 180 oder 210 Minuten setzte die intravasale  $\text{NO}_x$ -Emission prompt mit der Reperfusion und dem Wechsel des Beatmungsgases zurück zum sauerstoffhaltigen Gasgemisch wieder ein. Die

gemessenen  $\text{NO}_x$ -Produktionsraten zeigten den Kontrollgruppen vergleichbare Messwerte.

Kaninchenlungen, die vor Ischämiebeginn mit dem unspezifischen NO-Synthase Inhibitor L-NMMA behandelt wurden ( $\text{FiO}_2 = 0,21 + \text{L-NMMA}$ ,  $\text{FiO}_2 = 0 + \text{L-NMMA}$ ) reagierten mit einer umgehenden und dauerhaften Suppression der  $\text{NO}_x$ -Liberation. Die Suppression bestand unabhängig von der Ischämieelänge auch weiterhin nach Reperfusion. Eine nennenswerte  $\text{NO}_x$ -Freisetzung wurde nicht dokumentiert.

In der Versuchsreihe anoxische Ischämie mit Applikation von 100 U/ml SOD ( $\text{FiO}_2 = 0 + \text{SOD}$ ) zu Ischämieende kam es, vergleichbar den Versuchsreihen oxische und anoxische Ischämie, nach Reperfusion zum sofortigen Wiedereinsetzen der  $\text{NO}_x$ -Synthese. Umgehend wurden auch hierbei wieder, den Kontrollgruppen entsprechende Werte erreicht.

Insgesamt zeigten sich gut korrespondierende Kurvenverläufe in allen Untersuchungsreihen zwischen der intravasalen und exhalativen NO-Liberation (vgl. Kap.4.1.1.).

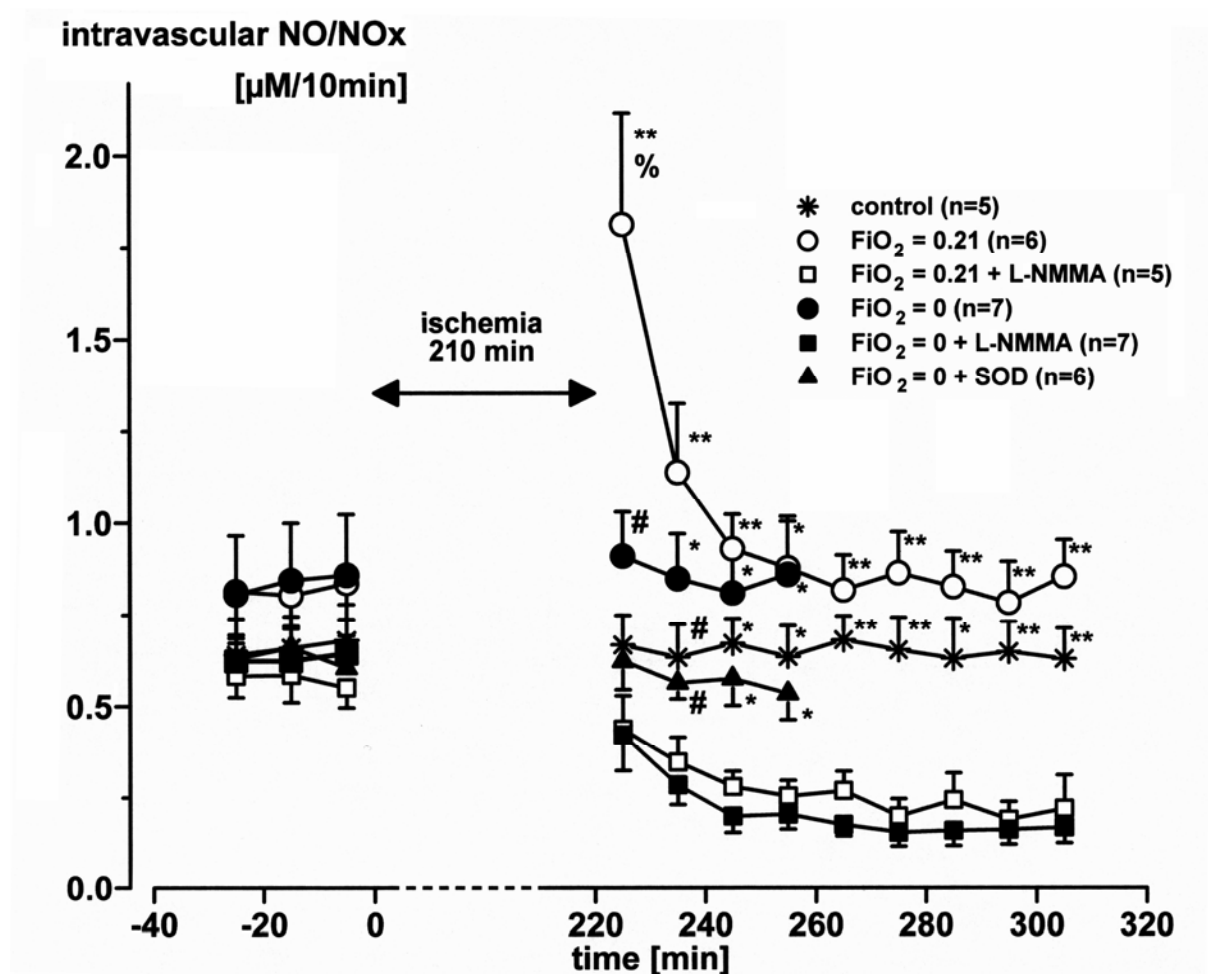


**Abb. 4.3.** Die intravasale NO<sub>x</sub>-Produktion vor Beginn und nach einer 180-minütigen Ischämieperiode zeigt die Auswirkungen einer normoxischen bzw. anoxischen Beatmung im Intervall sowie den Einfluss der L-NMMA Applikation auf die intravasale NO-Liberation.

Die Abb. 4.3. zeigt die intravasale NO<sub>x</sub>-Freisetzung (Summe von NO und dessen Abbauprodukten) vor und nach einer induzierten Ischämie von 180 Minuten Länge. Vor Ischämiebeginn wurden alle Versuchsreihen mit einem normoxischen Gasgemisch beatmet und kontinuierlich perfundiert. Abgesehen von den Kontrollversuchen, die keiner Ischämie ausgesetzt wurden, erfolgte in allen Versuchsreihen zum Zeitpunkt  $t=0$  der Perfusionsstopp. Während der Ischämieperiode erfolgte eine normoxische oder anoxische Ventilation und in den Versuchsreihen mit supprimierter NO-Synthase wurde jeweils 400µM L-NMMA 5 Minuten vor Ischämiebeginn dem Perfusat zugegeben. Wie die Messwerte verdeutlichen, hatte diese Inhibition auch nach Reperfusion anhaltend Bestand.

Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte aufgetragen als 10-Minuten Differenzintervall  $\pm$  S.E.M.. Die Anzahl der untersuchten Versuche pro Versuchsmodus stellt die n-Zahl dar.





**Abb. 4.4.** Einfluss von oxischer bzw. anoxischer Beatmung, L-NMMA- und SOD-Applikation auf die intravasale  $\text{NO}_x$ -Produktion vor und nach einer Ischämieperiode von 210 Minuten Dauer.

Die Abb. 4.4. vergleicht die intravasale  $\text{NO}_x$ -Produktion (Summe von NO und den entsprechenden Oxidationsprodukten) vor Ischämiebeginn und nach Reperfusion. Zu Beginn wurden alle Versuchsreihen normoxisch beatmet und kontinuierlich perfundiert. Zum Versuchszeitpunkt  $t=0$  wurden die Kaninchenlungen (außer der Kontrollgruppe) einer 210-minütigen Ischämie ausgesetzt, während dieser sie entweder normoxisch oder anoxisch ventiliert wurden. Die Zugabe von L-NMMA ( $400\mu\text{M}$ ) erfolgte in den entsprechenden Versuchsreihen 5 Minuten vor Ischämiebeginn, SOD ( $100\text{ U/ml}$ ) wurde dem Perfusat unmittelbar zur Reperfusion zugegeben.

Die gemittelten Ergebnisse sind als Differenzwert pro 10 min in  $\mu\text{M} \pm \text{S.E.M.}$  dargestellt. Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt.

Statistische Signifikanzen sind folgendermaßen markiert: \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  gegenüber den L-NMMA Versuchsgruppen, #  $p < 0,05$  gegenüber  $\text{FiO}_2 = 0 + \text{L-NMMA}$ , %  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe,  $\text{FiO}_2 = 0$  und  $\text{FiO}_2 = 0 + \text{SOD}$ .

#### 4.1.3. Messergebnisse der intravasalen NO<sub>x</sub>-Analyse im Ischämieintervall als Kumulativ-Befund

Wie bereits im Kap. 4.1.2. erwähnt, konnten während der Ischämiephase und dem darin begründeten Perfusionsstopp keine weiteren Perfusatproben entnommen werden. Somit war auch keine weitere Online-Messung der intravasalen NO<sub>x</sub>-Konzentration möglich. Um dennoch eine Aussage zum NO-Liberationsverhalten im Ischämieintervall zu erhalten, wurden die Differenzwerte zwischen den Messergebnissen zum Versuchszeitpunkt 0 und 180 bzw. 210 Minuten gebildet. Somit konnten die Kumulativ-Befunde von 180 bzw. 210 Minuten Ischämie in µM ermittelt und dargestellt werden. Um einen Vergleich der Ergebnisse mit der Kontrollgruppe (control) zu ermöglichen, wurden hierfür analog die korrespondierenden Intervallwerte berechnet (siehe Abb. 4.5. und Abb. 4.6.).

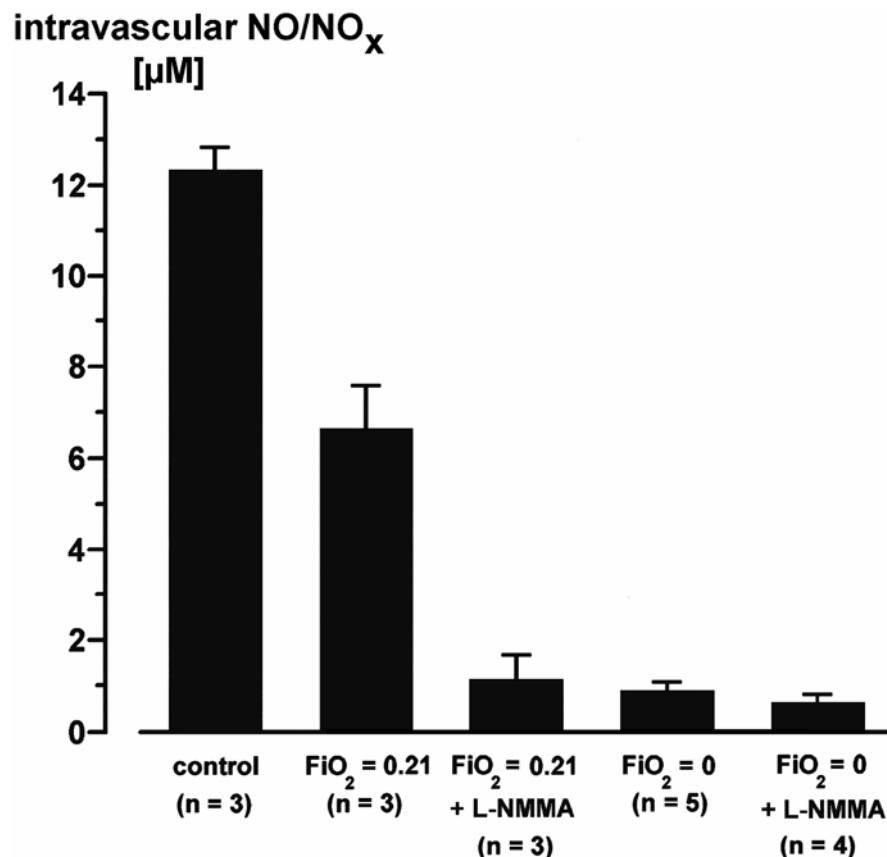
In den Kontrollversuchen ergab sich eine NO<sub>x</sub>-Akkumulation im Perfusat von etwa 12 µM nach 180 Minuten und eine von 15 µM nach 210 Minuten.

Im Vergleich hierzu setzten die Lungen während einer normoxisch ventilierten Ischämieperiode (FiO<sub>2</sub> = 0,21) noch etwa die Hälfte, nämlich 7 µM nach 180 Minuten und 8 µM nach 210 Minuten Ischämie frei.

Wurde den Versuchen L-NMMA vor Ischämiebeginn zugesetzt (FiO<sub>2</sub> = 0,21 + L-NMMA, FiO<sub>2</sub> = 0 + L-NMMA), so erfolgte keine nennenswerte NO<sub>x</sub>-Synthese mehr. Ebenso emittierten die Kaninchenlungen während der Ischämieperiode unter anoxischen Bedingungen (FiO<sub>2</sub> = 0) annähernd kein NO<sub>x</sub> in das Gefäßbett.

Da die Zugabe von 100 U/ml SOD in der entsprechenden Versuchsreihe (FiO<sub>2</sub> = 0 + SOD) erst zur Reperfusion erfolgte, wurden hier Ergebnisse den anoxischen Ischämieversuchen vergleichbar dokumentiert: Es kam zu keiner nennenswerten NO<sub>x</sub>-Produktion während des Ischämieintervalls.

Es lies sich somit feststellen, dass auch die im Ischämieintervall berechneten NO<sub>x</sub>-Synthesemengen zu den zuvor beschriebenen exhalativen NO-Messdaten korrespondierten. Qualitativ ergaben sich keine Unterschiede durch die Variation der Ischämielänge (180 und 210 Minuten).

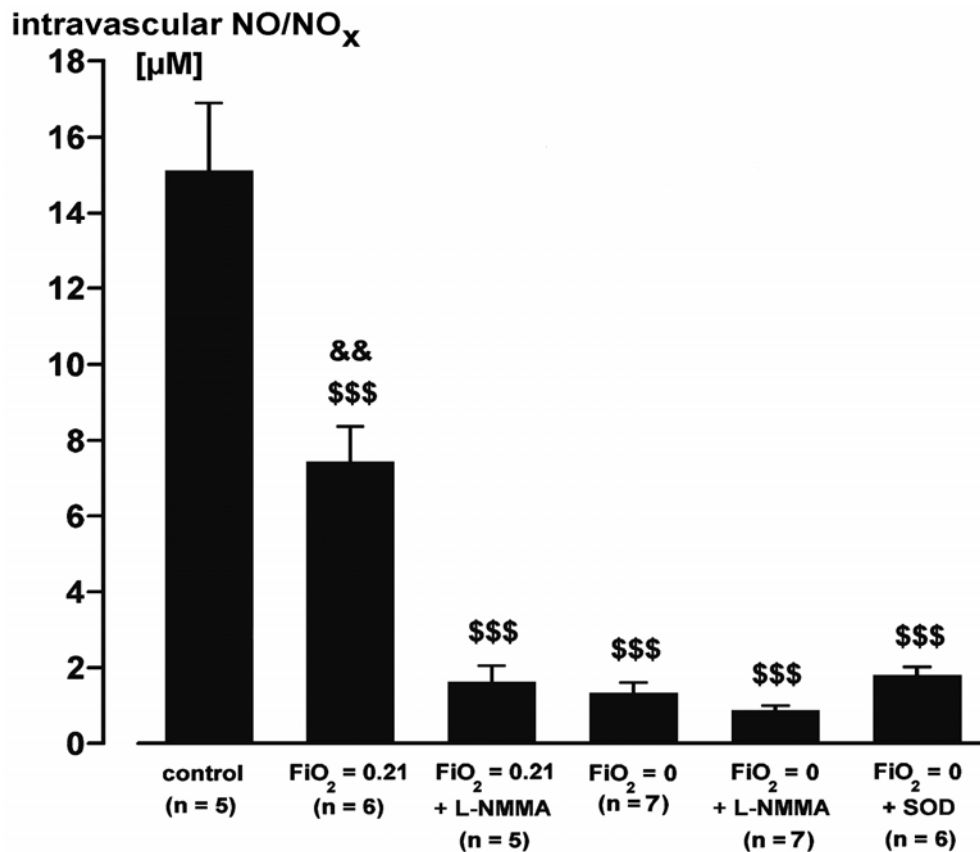


**Abb. 4.5.** Vergleich der intravasalen NO<sub>x</sub>-Akkumulation im Zeitintervall der 180-minütigen Ischämie. Zu erkennen ist der Einfluss von normoxischer und anoxischer Ventilation sowie die Wirkung der L-NMMA Gabe vor Ischämiebeginn auf die intravasale NO-Syntheseleistung.

In Abb. 4.5. ist die intravasale NO<sub>x</sub>-Akkumulation während einer 180 Minuten andauernden Ischämiephase dargestellt.

Hierbei erkennt man, dass eine fortgesetzte normoxische Ventilation und Perfusion ohne eine Ischämieperiode (control) zu einer NO<sub>x</sub>-Akkumulation im Perfusat von mehr als 12 μM führte. Eine normoxisch ventilierte Ischämie (FiO<sub>2</sub> = 0,21) bewirkte eine Reduktion der NO<sub>x</sub>-Synthese auf etwa die Hälfte des Niveaus der Kontrollgruppe. Anoxische Ischämieperioden (FiO<sub>2</sub> = 0) führten ebenso wie die Versuche mit inhibierter NO-Synthase durch L-NMMA (400 μM) zu einer fast vollständigen Unterdrückung der NO<sub>x</sub>-Produktion (FiO<sub>2</sub> = 0,21 + L-NMMA, FiO<sub>2</sub> = 0 + L-NMMA).

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± S.E.M., n bezeichnet die Anzahl der Versuche pro Beobachtungsreihe.



**Abb. 4.6.** Einfluss der Anwesenheit von Sauerstoff, L-NMMA und SOD auf die intravasale NO<sub>x</sub>-Produktion während einer Ischämieperiode von 210 Minuten Dauer.

Die Abb. 4.6. zeigt die intravasal akkumulierte Menge an NO<sub>x</sub>, die während einer 210-minütigen Ischämieperiode in das Perfusat abgegeben wurde.

Die Kontrollversuche (control) zeigen die Menge an synthetisiertem NO<sub>x</sub>, die unter fortgesetzter Perfusion und normoxischer Ventilation ohne eine Ischämieperiode ins Perfusat sezerniert wurde. Auffällig ist, dass bei fortbestehender normoxischer Ventilation unter Ischämiebedingungen (FiO<sub>2</sub> = 0,21) die NO<sub>x</sub>-Synthese fortbestand und die Produktion auf etwa die Hälfte der Kontrollgruppe sank. Bei Versuchen mit einer anoxischen Ischämiephase (FiO<sub>2</sub> = 0) sowie Untersuchungen mit inhibierter NO-Synthase durch 400 μM L-NMMA kam die NO<sub>x</sub>-Produktion fast vollständig zum Erliegen (FiO<sub>2</sub> = 0,21 + L-NMMA, FiO<sub>2</sub> = 0 + L-NMMA). Da die Applikation von 100 U/ml SOD erst zur Reperfusion erfolgte, konnte sie keinen nennenswerten Einfluss auf die Ischämieperiode ausüben – die Messwerte entsprachen denen der anoxischen Ischämieperiode (FiO<sub>2</sub> = 0 + SOD).

Die Angaben verstehen sich als Mittelwerte ± S.E.M.. Die Anzahl der Versuche beschreibt die n-Zahl. Signifikanzen werden folgendermaßen beschrieben: && p < 0,01 gegen alle anderen Versuchsreihen, \$\$\$ p < 0,001 gegen die Kontrollgruppe.

#### 4.1.4. Verlauf des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP)

Der kontinuierlich erfasste pulmonal-arterielle Druck (PAP) zeigte in den Kontrollversuchen (control) mit einer Versuchslänge von bis zu 320 Minuten keine Veränderungen und konstante Druckwerte um 6 mmHg.

Alle Versuchsreihen zeigten während der steady-state-Phase vor Beginn der Ischämieperiode den Kontrollgruppen vergleichbare Druckwerte. Inhibition der NO-Synthese durch Zugabe des unspezifischen NO-Synthase-Inhibitors L-NMMA hatte keinen signifikanten Effekt auf den prä-ischämischen Gefäßtonus.

Zu Ischämiebeginn wurde in den Versuchsreihen mit 180- und 210-minütiger Ischämie der intravasale Druck auf 6 mmHg eingestellt. Bis zum Ende der Ischämiezeit sank dieser kontinuierlich auf Werte zwischen 3,8 und 3,3 mmHg nach 180 Minuten bzw. auf 3,2 bis 2,2 mmHg nach 210 Minuten (siehe Tab. 4.1.).

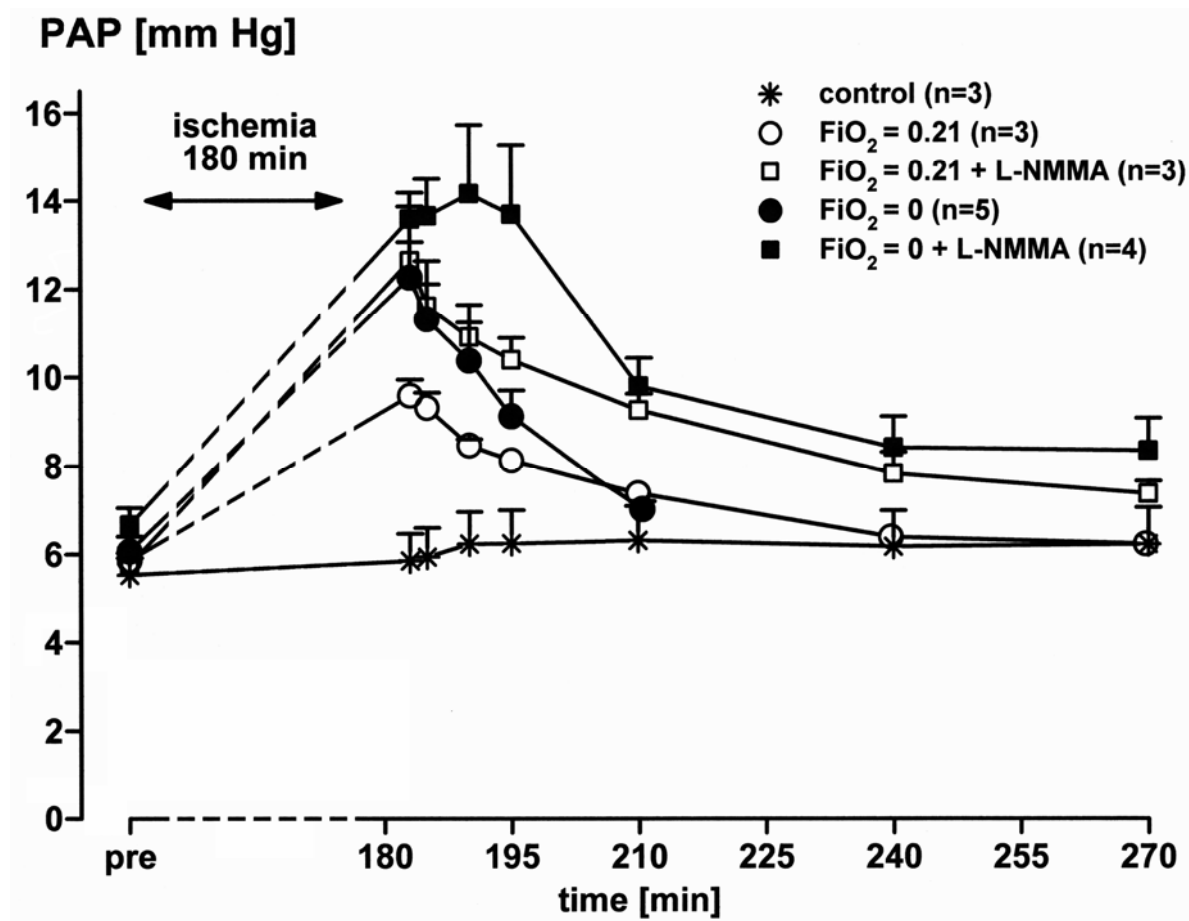
	FiO <sub>2</sub>	Ischämiezeit	Intravaskulärer Druck am Ende der Ischämie [mmHg]	n
<b>Kontrolle</b>	0,21	<i>Keine Ischämie</i>	<i>Keine Ischämie</i>	3
<b>Normoxische Ischämie</b>	0,21	180	3,4 ± 0,6	3
<b>Normoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0,21	180	3,3 ± 0,1	3
<b>Anoxische Ischämie</b>	0	180	3,5 ± 0,5	5
<b>Anoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0	180	3,8 ± 0,5	4
<b>Kontrolle</b>	0,21	<i>Keine Ischämie</i>	<i>Keine Ischämie</i>	5
<b>Normoxische Ischämie</b>	0,21	210	2,2 ± 0,1	6
<b>Normoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0,21	210	3,2 ± 0,2	5
<b>Anoxische Ischämie</b>	0	210	2,3 ± 0,2	7
<b>Anoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0	210	2,8 ± 0,2	7
<b>Anoxische Ischämie + SOD</b>	0	210	2,8 ± 0,3	6

**Tab. 4.1.** Intravasale Druckwerte am Ende der Ischämie. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwerte ± S.E.M.. Die Anzahl der Versuche pro Versuchsreihe beschreibt die n-Zahl.

Nach Beendigung der Ischämie und Reperfusion wurde unabhängig vom untersuchten Ischämieintervall (180 und 210 Minuten) in allen Versuchsreihen ein vorübergehender pulmonal-arterieller Druckanstieg beobachtet. Kurzfristig relativ höhere Druckwerte waren in den Versuchsreihen mit blockierter NO-Synthase durch L-NMMA ( $\text{FiO}_2 = 0 + \text{L-NMMA}$  und  $\text{FiO}_2 = 0,21 + \text{L-NMMA}$ ) und den anoxischen Versuchsreihen mit und ohne Zugabe von Superoxid-Dismutase (SOD) zu beobachten ( $\text{FiO}_2 = 0$  und  $\text{FiO}_2 = 0 + \text{SOD}$ ).

In den Versuchsreihen mit einer anoxischen Ischämieperiode ( $\text{FiO}_2 = 0$ ) und einer anoxischen Ischämie mit Zugabe SOD zur Reperfusion ( $\text{FiO}_2 = 0 + \text{SOD}$ ) trat ein schwerwiegender Gefäßschaden mit deutlicher Ödembildung zu Tage. Daher wurden diese Versuche nach der ersten postischämischen Kfc-Messung vorzeitig beendet (vgl. Kap 3.5.).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es nach einem Ischämie-/ Reperfusionsmanöver zu einem kurzfristigen, moderaten Druckanstieg in allen Versuchsgruppen kam. Bereits 30 Minuten nach Reperfusion näherten sich die Druckwerte allerdings wieder den Werten der Kontrollgruppen an. Statistisch ließen sich keine signifikanten Unterschiede ermitteln.



**Abb. 4.7.** Prä- und postischämischer PA-Druckverlauf bei Versuchen mit 180-minütiger Ischämiezeit.

Dargestellt ist in Abb. 4.7. der Verlauf des prä- und postischämischen pulmonal-arteriellen Drucks (PAP). Die Kaninchenlungen wurden einer 180-minütigen Ischämieperiode ausgesetzt. Während dieser erfolgte eine normoxische oder anoxische Beatmung. In der Kontrollgruppe ohne Ischämie wurden die Lungen kontinuierlich perfundiert und normoxisch ventiliert.

Versuchsreihen, in denen der unspezifische NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA (400  $\mu$ M) appliziert wurde, erhielten diesen zur gleichmäßigen Verteilung im Organ 5 Minuten vor Ischämiebeginn zum Perfusat zugesetzt.

Die Messwerte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben, n gibt die Anzahl der Experimente pro Versuchsreihe wieder. Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt.

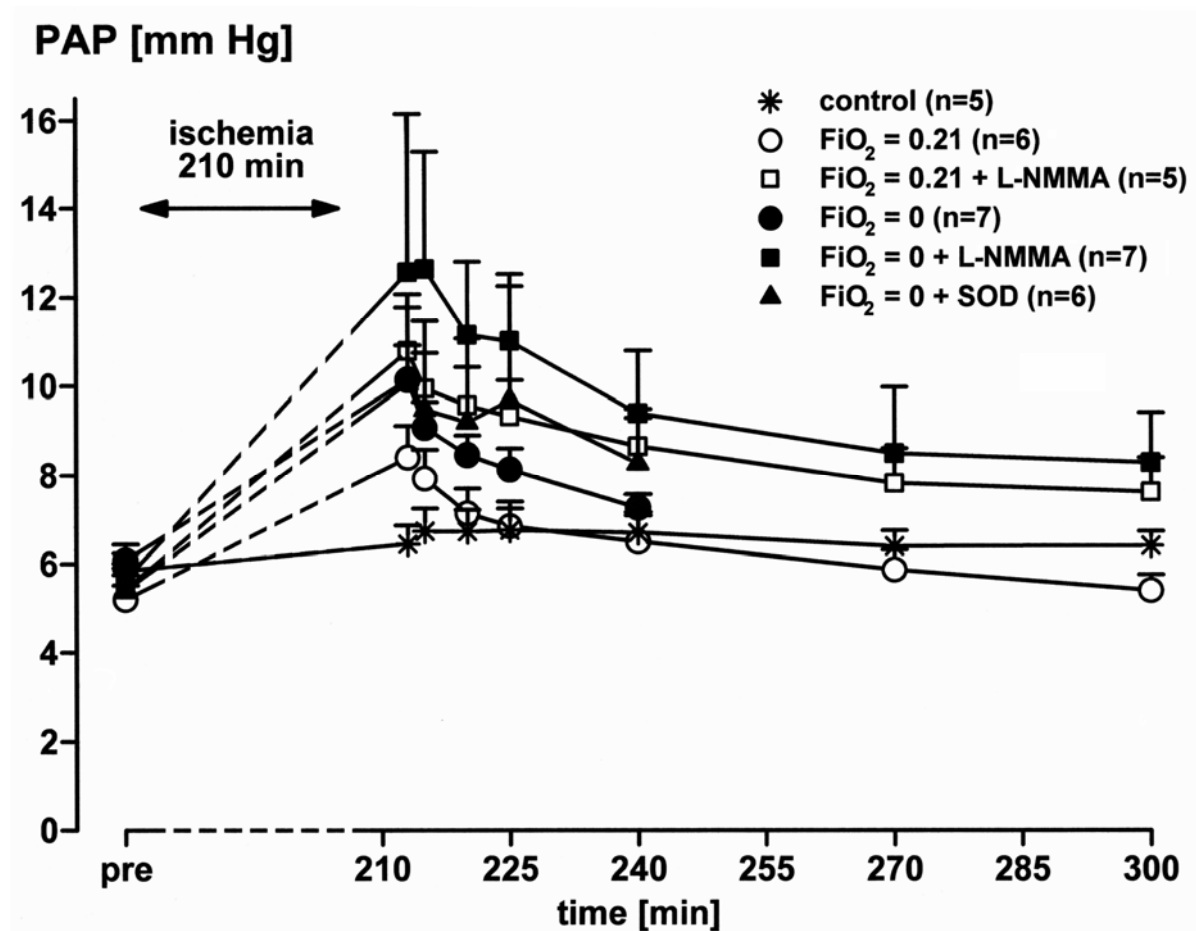


Abb. 4.8. PA-Druckverlauf der einzelnen Versuchsreihen vor und nach 210 Minuten Ischämie.

Abb. 4.8. zeigt den prä- und post ischämischen pulmonal-arteriellen Druckverlauf (PAP) der einzelnen Versuchsreihen mit einer normoxisch bzw. anoxisch ventilierten 210-minütigen Ischämieperiode. Ebenfalls aufgeführt wurde die entsprechende Kontrollgruppe, die ohne Ischämie bei kontinuierlicher Perfusion und normoxischer Beatmung analysiert wurde.

Versuchsreihen, die unter Zugabe des unspezifischen NO-Synthase-Inhibitors L-NMMA (400  $\mu$ M) untersucht wurden, bekamen diesen zur vollständigen Inhibition 5 Minuten vor Ischämiebeginn in die Perfusionslösung appliziert.

In einer Versuchsreihe wurde Superoxid-Dismutase (SOD, 100 U/ml) unmittelbar vor Reperfusion am Ende der anoxischen Ischämie verabreicht.

Die Messergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben, n entspricht der Anzahl der Versuch je Untersuchungsreihe. Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt.



#### 4.1.5. Ergebnisse der prä- und postischämischen Messung des kapillären Filtrationskoeffizienten (K<sub>fc</sub>), der Gewichtsretention und der Gefäßcompliance

Die Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten erfolgte in allen Versuchsreihen zu standardisierten Zeitpunkten (vor Ischämiebeginn sowie 30, 60 und 90 Minuten nach Reperfusion bzw. zu den korrespondierenden Zeiten in den Kontrolluntersuchungen). Neben den K<sub>fc</sub>-Werten wurden während dieses Manövers auch die Gewichtsretention und die Gefäßcompliance ermittelt (siehe Kap. 3.2.3).

Die prä-ischämischen Messergebnisse zeigten eine homogene Verteilung der Messwerte in allen Versuchsreihen mit K<sub>fc</sub>-Werten um 1 [ $\text{cm}^3/\text{s} \cdot \text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{g} \cdot 10^4$ ], einer Gewichtsretention von 1,1 bis 2,4 g und einer Gefäßcompliance zwischen 0,55 und 0,67 [ $\text{g}/\text{cmH}_2\text{O}$ ] (siehe Abb. 4.9., 4.10., 4.11., 4.12 und Tab. 4.2.).

Im Gegensatz hierzu zeigten die Versuchsreihen mit 180 und 210 Minuten anoxischer ventilierter Ischämie ( $\text{FiO}_2 = 0$ ) während der K<sub>fc</sub>-Messung 30 Minuten nach Reperfusion einen dramatischen Anstieg des kapillären Filtrationskoeffizienten. Es zeigte sich während der Messungen ein so massives Lungenödem, dass diese Versuche anschließend abgebrochen werden mussten. Die Ödembildung spiegelte sich in einem signifikanten Anstieg der Gewichtsretention wieder (siehe Abb. 4.9., 4.10., 4.11. und 4.12.).

Die Versuchsreihe 210 Minuten anoxische Ischämie mit SOD-Applikation zur Reperfusion ( $\text{FiO}_2 = 0 + \text{SOD}$ ) wies ebenfalls einen deutlichen, wenngleich weniger ausgeprägten Zuwachs der K<sub>fc</sub>- und Retentionswerte auf. Aber auch diese Versuchsreihe musste im Anschluss an die K<sub>fc</sub>-Messung aufgrund der massiven Ödembildung abgebrochen werden.

Die Messergebnisse der anoxischen Ischämieversuche unter Anwesenheit von L-NMMA ( $\text{FiO}_2 = 0 + \text{L-NMMA}$ ) zeigten im Vergleich zur anoxischen Ischämie ohne L-NMMA ( $\text{FiO}_2 = 0$ ) nach Reperfusion eine deutliche Reduktion des Gefäßschadens. Dies wurde in den protokollierten K<sub>fc</sub>- und Retentionswerten deutlich, die auf dem Niveau der normoxisch ventilerten Ischämieversuche ( $\text{FiO}_2 = 0,21$ ) lagen. Somit

konnte nach Zugabe von L-NMMA nach einer anoxischen Ischämie eine geringere Ödembildung und eine niedrigere Gewichtsretention beobachtet werden, als ohne L-NMMA.

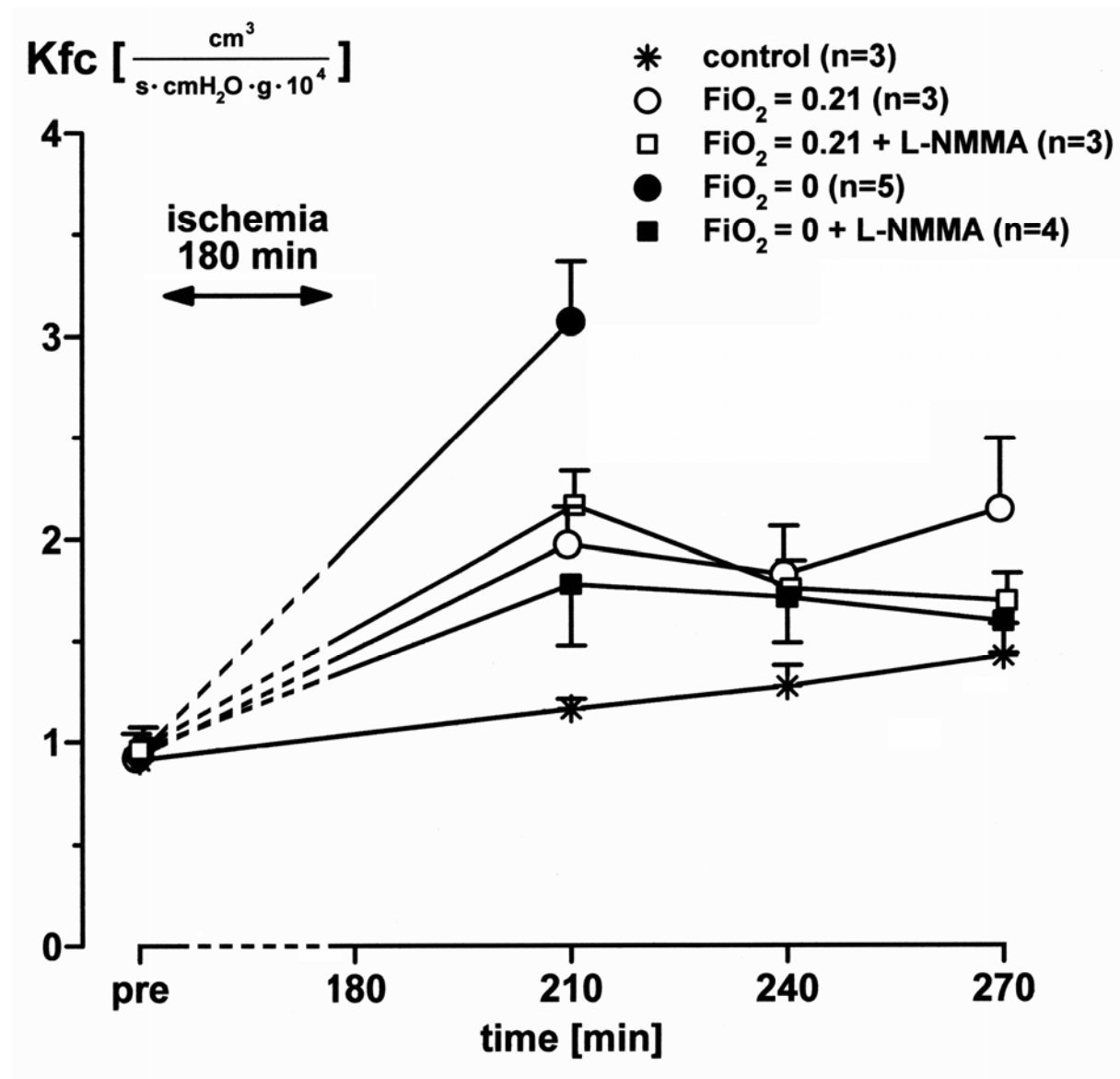
Die Versuchsreihen oxische Ischämie ( $\text{FiO}_2 = 0,21$ ) und oxische Ischämie mit L-NMMA Gabe ( $\text{FiO}_2 = 0,21 + \text{L-NMMA}$ ) wiesen nach Reperfusion eine deutlich geringere Erhöhung der Kfc- und Retentionswerte auf, als die anoxisch ventilierten Ischämierungen ( $\text{FiO}_2 = 0$ ). Jedoch bestand nach wie vor ein im Vergleich zur Kontrolle (control) signifikanter Anstieg dieser Messparameter.

Allerdings kam es bei den normoxischen Ischämie-Versuchsreihen zu keinem signifikanten Unterschied zwischen der Vorbehandlung mit L-NMMA oder ohne dessen Applikation.

Aufgrund der kürzeren Ischämiezeiten bzw. der geringeren Versuchszahlen zeigten die Ergebnisse der 180-minütigen Ischämieversuche absolut betrachtet niedrigere Werte und eine geringfügig größere Streuung der einzelnen Messergebnisse. Allerdings sind diese qualitativ mit denen der 210-minütigen Ischämie konkordant.

In den Kontrollgruppen ergaben sich unabhängig von der Versuchslänge (control 180 oder 210 Minuten) nur geringfügige Veränderungen für den Kfc-Wert, die Gewichtsretention und die Gefäßcompliance. Statistisch konnten keine Signifikanzen ermittelt werden.

Die Bestimmung der Gefäßcompliance ergab in allen Versuchsreihen eine geringe Schwankungsbreite. Es wurden keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen offensichtlich (siehe Tab. 4.2.).



**Abb. 4.9.** Ergebnisse der prä- und postischämischen Kfc-Messung in den 180-minütigen Ischämie-Versuchsreihen.

In Abb. 4.9. ist der postischämische Gefäßschaden dargestellt und anhand des kapillären Filtrationskoeffizienten (Kfc) quantifiziert. Bestimmt wurde der Kfc-Wert vor Ischämie und in 30 Minuten-Abständen nach Reperfusion. Die Kontrollgruppe wurde ohne Ischämieintervall kontinuierlich perfundiert und normoxisch ventiliert. L-NMMA (400  $\mu\text{M}$ ) wurde in den entsprechenden Versuchsreihen 5 Minuten vor Ischämiebeginn zum Perfusat zugegeben.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Die Anzahl der Versuche je Versuchsreihe gibt die n-Zahl an. Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt.

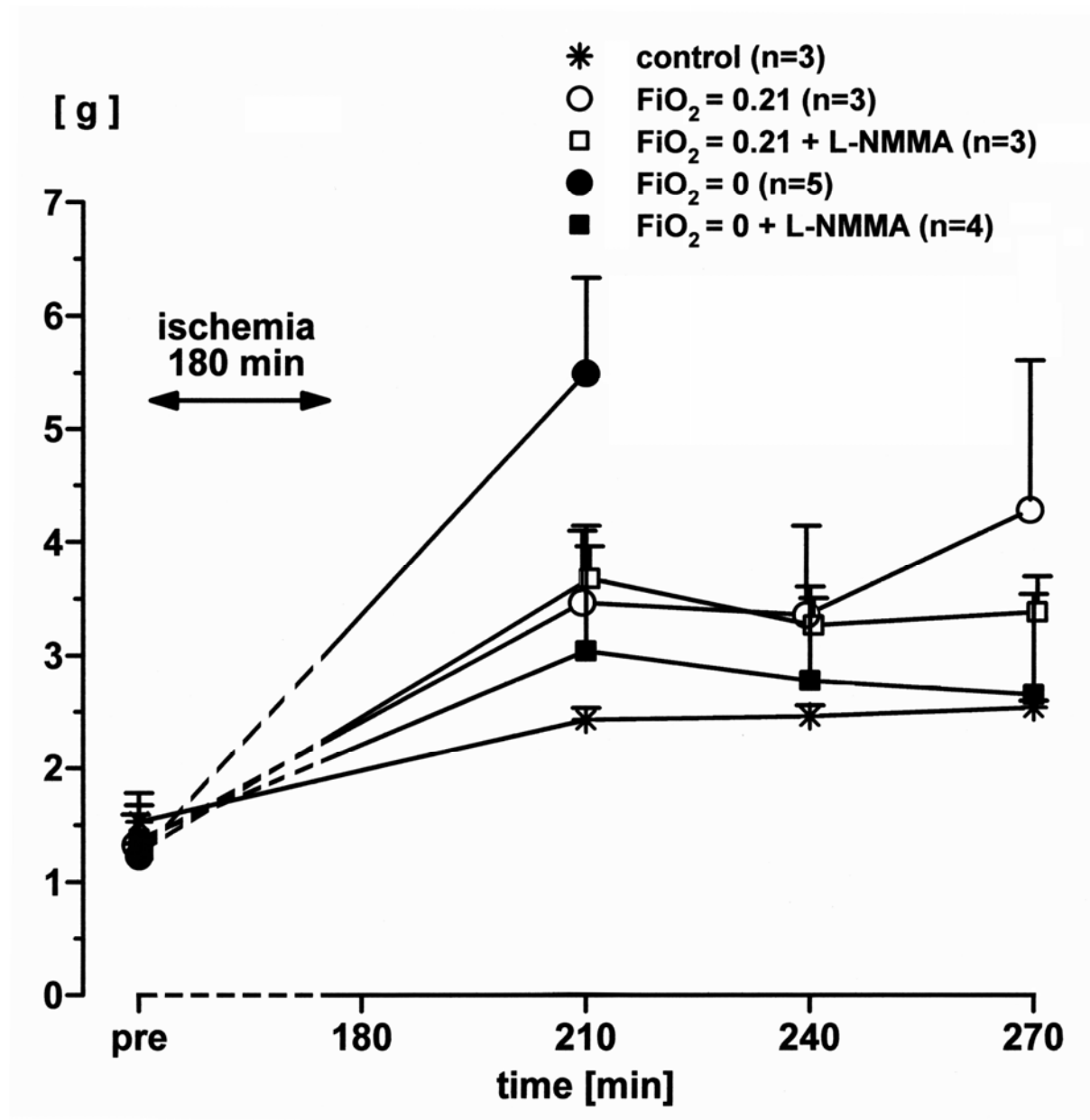
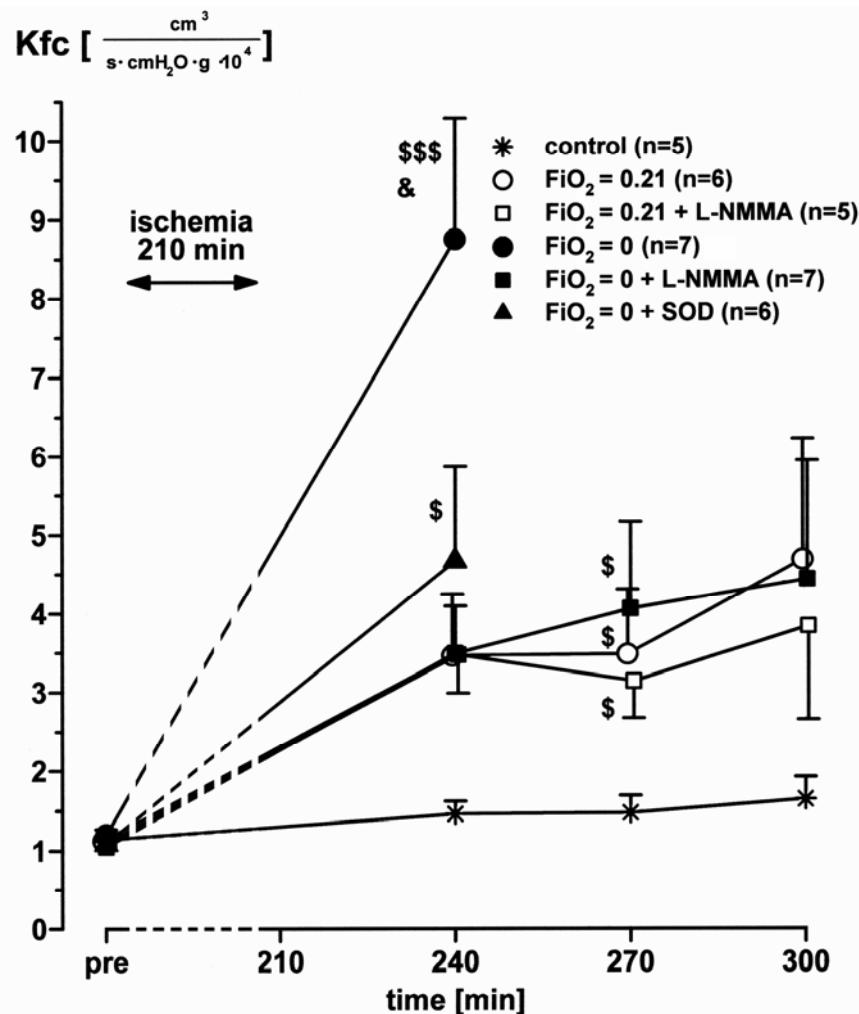


Abb. 4.10. Vergleich der Gewichtsretention vor und nach 180-minütiger Ischämie.

Neben dem Kfc ist der Gefäßschaden auch durch das entstehende Ödem zu quantifizieren. Abb. 4.10. stellt die Gewichtsretention der isolierten Lungen in den jeweiligen Versuchsreihen mit 180 Minuten Ischämie graphisch dar. Die Kontrollversuche wurden ohne Interventionen unter kontinuierlicher Ventilation und Perfusion durchgeführt. Der NO-Synthase-Hemmer L-NMMA (400  $\mu\text{M}$ ) wurde 5 Minuten vor Ischämiebeginn dem Perfusat zugesetzt.

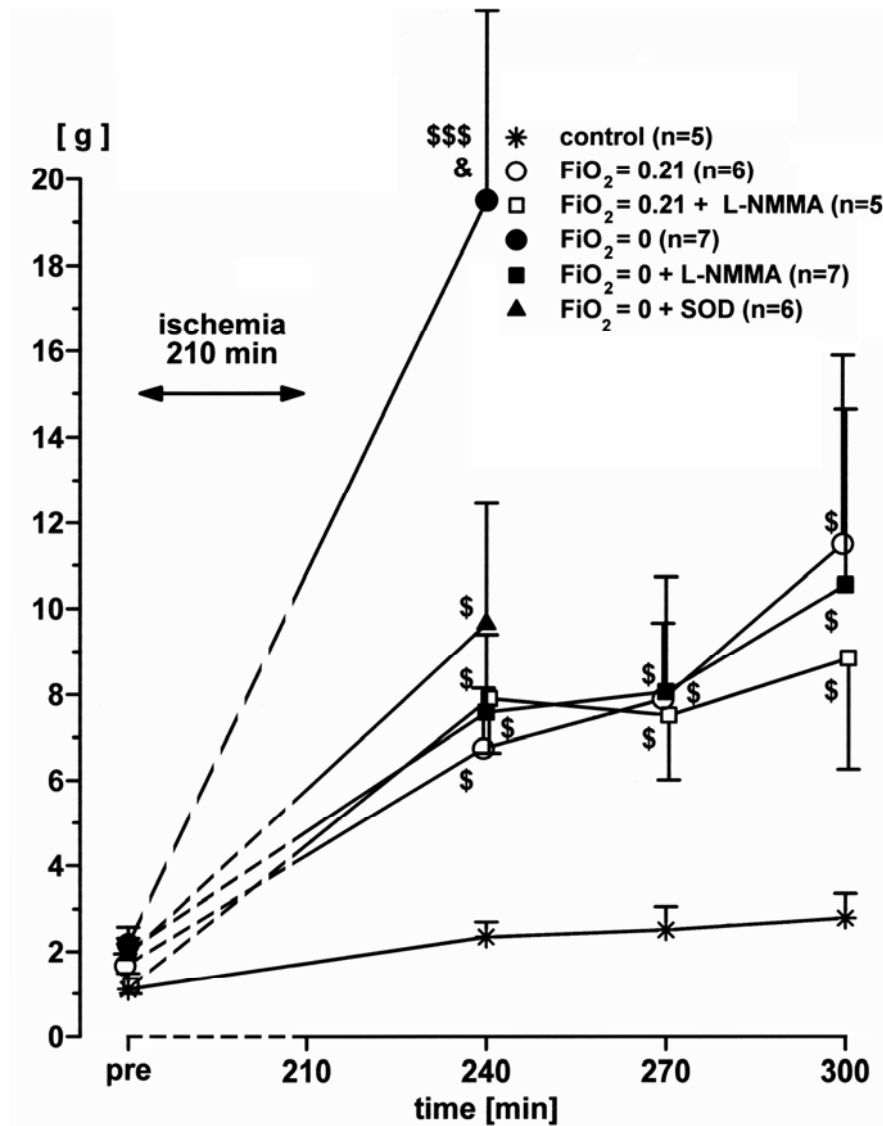
Die Messwerte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M., die Anzahl der Experimente pro Versuchsreihe entspricht der n-Zahl. Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt.



**Abb. 4.11.** Vergleich der prä- und postischämischen Kfc-Werte der Versuchsreihen mit einer 210-minütigen Ischämie.

Abb. 4.11. verdeutlicht den postischämischen Gefäßschaden, charakterisiert durch den kapillären Filtrationskoeffizienten (Kfc), der vor Ischämie und in 30-minütigen Intervallen nach Reperfusion bestimmt wurde. Kontrollmessungen wurden ohne Intervention bei fortgesetzter Perfusion und Ventilation durchgeführt. Eindrucksvoll stellt sich der Einfluss von L-NMMA (400  $\mu\text{M}$ ) und Superoxid-Dismutase (SOD) nach Reperfusion dar. L-NMMA (400  $\mu\text{M}$ ) wurde 5 Minuten vor Ischämie zum Perfusat gegeben, SOD (100 U/ml) wurde zur Reperfusion in die Perfusionslösung injiziert. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben, Fehlerbalken sind nicht dargestellt, wenn sie im Versuchssymbol liegen. Die Versuchsanzahl entspricht n.

\$ markiert eine statistische Signifikanz mit  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe, \$\$\$ ist signifikant mit  $p < 0,001$  zur Kontrollreihe und & zeigt eine Signifikanz von  $p < 0,05$  im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen.



**Abb. 4.12.** Prä- und postischämische Gewichtsretentionen nach 210 Minuten Ischämie im Vergleich.

Ergänzend neben dem Kfc-Wert lässt sich der Gefäßschaden anhand der Ödembildung bewerten. Hierzu stellt Abb. 4.12. die prä- und postischämischen Gewichtsretentionen dar. Die Versuchskontrollen erfolgten bei kontinuierlicher Perfusion und Ventilation. Auffällig ist hierbei der Effekt von L-NMMA (400  $\mu$ M) und Superoxid-Dismutase (SOD). L-NMMA (400  $\mu$ M) wurde zur Perfusionslösung 5 Minuten vor Ischämiebeginn appliziert, zur Reperfusion erfolgte die Gabe von SOD (100 U/ml) zum Perfusat.

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Fehlende Fehlerbalken fallen in das Symbol. Die Beobachtungszahl gibt der n-Wert an.

Statistische Signifikanzen werden folgendermaßen bezeichnet: \$ ist mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber der Kontrollgruppe; \$\$\$ mit  $p < 0,001$  signifikant zur Kontrollreihe; & Signifikanz mit  $p < 0,05$  im Gegensatz zu allen anderen Ischämiegruppen.

	FiO <sub>2</sub>	Ischämie-zeit	Compliance-Werte [g/cmH <sub>2</sub> O]				n
			Prä-Ischämie	30 min nach Reperfusion	60 min nach Reperfusion	90 min nach Reperfusion	
<b>Kontrolle der 180 min Ischämie</b>	0,21	Keine Ischämie	0,6 ± 0,0	0,55 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,58 ± 0,03	3
<b>Normoxische Ischämie</b>	0,21	180	0,59 ± 0,04	0,54 ± 0,05	0,55 ± 0,04	0,58 ± 0,05	3
<b>Normoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0,21	180	0,6 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,5 ± 0,04	0,53 ± 0,05	3
<b>Anoxische Ischämie</b>	0	180	0,65 ± 0,02	0,61 ± 0,04			5
<b>Anoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0	180	0,55 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,48 ± 0,03	4
<b>Kontrolle der 210 min Ischämie</b>	0,21	Keine Ischämie	0,62 ± 0,02	0,57 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,58 ± 0,02	5
<b>Normoxische Ischämie</b>	0,21	210	0,64 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,69 ± 0,04	6
<b>Normoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0,21	210	0,64 ± 0,09	0,48 ± 0,06	0,53 ± 0,06	0,5 ± 0,09	5
<b>Anoxische Ischämie</b>	0	210	0,58 ± 0,03	0,49 ± 0,05			7
<b>Anoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0	210	0,6 ± 0,05	0,5 ± 0,04	0,52 ± 0,05	0,53 ± 0,06	7
<b>Anoxische Ischämie + SOD</b>	0	210	0,67 ± 0,03	0,56 ± 0,03			6

**Tab. 4.2.** Auflistung der erhobenen Messdaten für die Gefäßcompliance. Die Tabelle ist anhand der Ischämie-länge gegliedert. Die Messergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. angegeben. Die Anzahl der Versuche pro Versuchsreihe beschreibt n.

#### 4.1.6. Entwicklung des mikrovaskulären Drucks

Der mikrovaskuläre Druck wurde mit der „Double-Clamping“-Messtechnik (siehe Kap. 3.2.2.) in allen Versuchsreihen zu festgelegten Zeitpunkten vor Ischämiebeginn sowie 3, 30, 60 und 90 Minuten nach Reperfusion bestimmt. In den Kontrollversuchen ohne Ischämie wurden die Messwerte zu den entsprechend korrespondierenden Zeiten bestimmt.

Zu Versuchbeginn zeigten alle Versuchsreihen eine gleichmäßige Verteilung des mikrovaskulären Drucks zwischen 4,0 – 4,7 mmHg.

Der Vergleich der einzelnen Versuchsreihen mit der Kontrolle zu den korrespondierenden Zeitpunkten ergibt eine marginale Erhöhung des mikrovaskulären Drucks zum Zeitpunkt 3 Minuten nach Reperfusion.

In der zweiten, dritten und vierten Messung nach Reperfusion tendierten die gemessenen mikrovaskulären Drücke in allen Ischämieversuchen wieder zum Ausgangswert. Von der Betrachtung der dritten und vierten Messung waren die Versuchsreihen ausgenommen, die aufgrund einer starken Ödementwicklung 30 Minuten nach Reperfusion abgebrochen werden mussten ( $\text{FiO}_2 = 0$ ; 180 Minuten Ischämie,  $\text{FiO}_2 = 0$  sowie  $\text{FiO}_2 = 0 + \text{SOD}$ ; 210minütige Ischämieperiode).

In Tabelle 4.3. sind die Messergebnisse im Einzelnen aufgelistet.



	FiO <sub>2</sub>	Ischämie-zeit	Verlauf der mikrovaskulären Druckwerte [mmHg]					n
			Prä-Ischämie	3 min nach Reperfusion	30 min nach Reperfusion	60 min nach Reperfusion	90 min nach Reperfusion	
<b>Kontrolle der 180 min Ischämie</b>	0,21	Keine Ischämie	4,0 ± 0,2	4,2 ± 0,2	4,5 ± 0,3	4,3 ± 0,4	4,3 ± 0,4	3
<b>Normoxische Ischämie</b>	0,21	180	4,1 ± 0,2	5,8 ± 0,2	4,9 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,5 ± 0,1	3
<b>Normoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0,21	180	4,5 ± 0,1	6,9 ± 0,5	6,3 ± 0,4	5,6 ± 0,4	5,4 ± 0,2	3
<b>Anoxische Ischämie</b>	0	180	4,5 ± 0,3	6,1 ± 0,3	5,0 ± 0,1			5
<b>Anoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0	180	4,6 ± 0,3	6,7 ± 0,5	6,0 ± 0,4	5,5 ± 0,2	5,2 ± 0,3	4
<b>Kontrolle der 210 min Ischämie</b>	0,21	Keine Ischämie	4,2 ± 0,3	4,8 ± 0,2	4,9 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,5 ± 0,2	5
<b>Normoxische Ischämie</b>	0,21	210	4,0 ± 0,2	5,3 ± 0,3	4,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1	3,9 ± 0,3	6
<b>Normoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0,21	210	4,2 ± 0,3	6,4 ± 0,7	5,2 ± 0,3	4,9 ± 0,3	4,9 ± 0,3	5
<b>Anoxische Ischämie</b>	0	210	4,5 ± 0,4	6,5 ± 0,4	5,0 ± 0,2			7
<b>Anoxische Ischämie + L-NMMA</b>	0	210	4,7 ± 0,4	6,6 ± 0,8	5,4 ± 0,5	5,2 ± 0,4	5,1 ± 0,4	7
<b>Anoxische Ischämie + SOD</b>	0	210	4,0 ± 0,3	5,6 ± 0,5	4,9 ± 0,3			6

**Tab. 4.3.** Vergleichstabelle zum Verhalten der mikrovaskulären Drücke während der einzelnen Ischämieversuche sowie der entsprechenden Kontrolluntersuchungen. Die Tabelle gibt die Mittelwerte ± S.E.M. wieder. Die Versuchsanzahl wird durch n beschrieben.

#### **4.2. Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 90-minütige Ischämie unter anoxischer Ventilation mit kollabierten Gefäßen**

In diesem Ergebnisteil sollen die Messergebnisse der kürzeren Ischämieperiode von 90 Minuten dargestellt werden. Bei diesen Versuchsreihen wurde zu Beginn der Ischämieperiode ein intravasaler Gefäßdruck von 0 mmHg eingestellt.

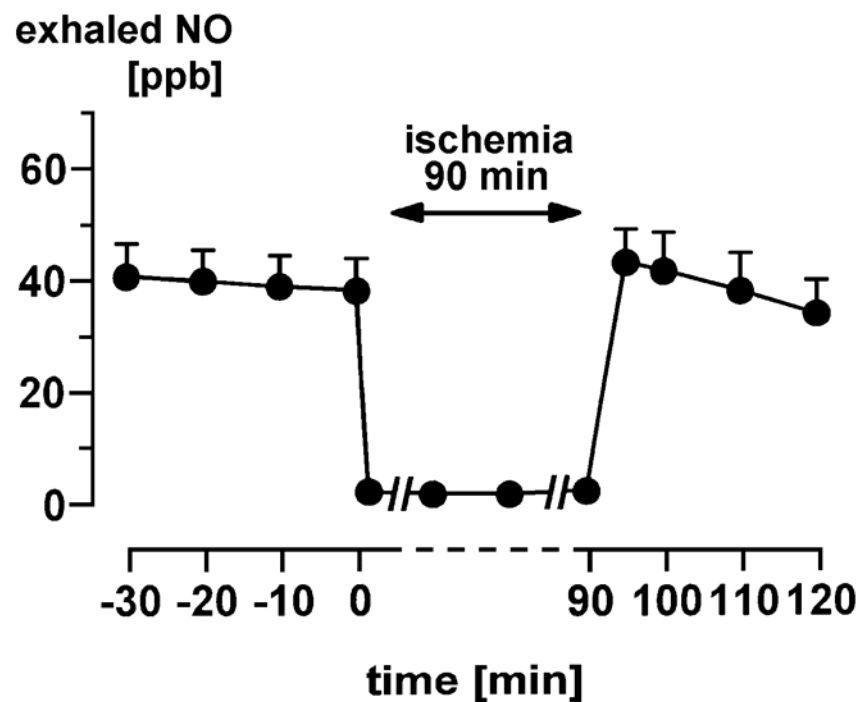
Schon 1998 konnten SCHÜTTE und HERMLE [119] aufzeigen, dass es während einer Ischämiephase mit kollabierten Gefäßen bereits nach einer kurzen anoxisch ventilierten Ischämieperiode zu einem erheblichen Organschaden kommt. Der so entstandene Schaden wäre unter vasaler Distension erst nach einer längeren Ischämieperiode zu erwarten gewesen.

##### **4.2.1. Ergebnisse der Stickstoffmonoxid (NO)-Analyse im exhalativen Atemgas vor, während und nach der Ischämieperiode**

Analog den Untersuchungen unter vaskulärer Distension wurde auch hier das exhalative Stickstoffmonoxid (NO) während der gesamten Versuchszeit kontinuierlich gemessen und in parts per billion (ppb) bestimmt (siehe Kap. 3.3.4.).

Unmittelbar mit dem Wechsel des Beatmungsgases zu Ischämiebeginn vom normoxischen zum sauerstofffreien Gasgemisch fiel das NO-Signal ab. Während dieser Periode kam es, vergleichbar der anoxischen Ischämieversuche mit 180 und 210 Minuten Länge, zum fast vollständigen Versiegen der NO-Produktion. Nach dem erneuten Wechsel des Beatmungsgases hin zu einem normoxischen Gasgemisch, kam es auch hier zum sofortigen Wiedereinsetzen der NO-Liberation und nach einer kurzen, überschießenden NO-Produktion pendelte sich die Syntheseleistung in der unmittelbaren Folge wieder auf dem Ausgangsniveau ein.

Somit konnte gezeigt werden, dass die NO-Produktion nach einer 90-minütigen anoxischen Ischämie mit kollabierten Lungengefäßen sofort nach Reperfusion wieder einsetzt und eine vollständige Restitution erreicht wurde (siehe Abb. 4.13.).



**Abb. 4.13.** Messwerte der exhalativen NO-Konzentration vor, während und nach einer 90-minütigen anoxisch ventilierten Ischämieperiode mit kollabierten Gefäßen (n=5).

In Abb. 4.13. wird deutlich, dass die NO-Produktion auch nach einer 90-minütigen anoxisch ventilerten Ischämie unter vasalem Kollaps (eingestellter intravasaler Druck von 0 mmHg) nach erneuter Oxygenierung des Atemgases und Reperfusion vollständig wiedereinsetzt. Zu Versuchsbeginn wurden die Lungen analog den 180- und 210-minütigen Versuchsreihen normoxisch ventilert und perfundiert. Die Versuchszeit  $t=0$  markiert den Beginn der Ischämie.

Die gezeigten Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt. Die Versuchsanzahl beschreibt n.

#### 4.2.2. Messergebnisse der intravasalen NO<sub>x</sub>-Analyse vor und nach der Ischämieperiode

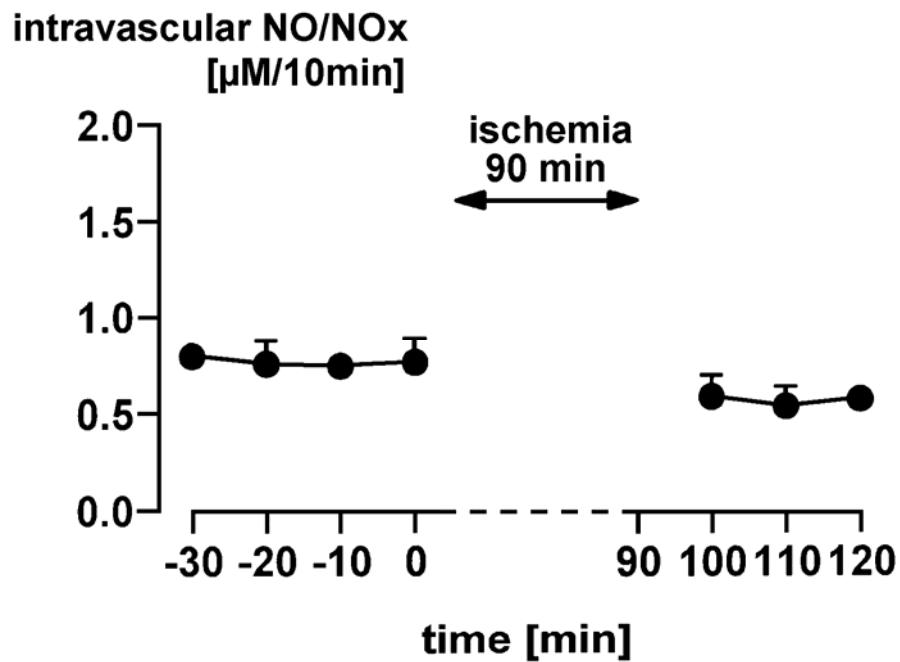
Analog den zuvor beschriebenen Versuchsreihen erfolgte auch bei den 90-minütigen Ischämieuntersuchungen die kontinuierliche Bestimmung der vor und nach Ischämie ins Perfusat sezernierten NO<sub>x</sub>-Menge mit Hilfe der Vanadium(III)Chlorid-Säule. Eine Probenentnahme während der Ischämieperiode konnte auch hier aufgrund der dann unterbrochenen Organperfusion nicht durchgeführt werden.

Nach der anschließenden computergestützten Umrechnung der Messwerte konnte die NO<sub>x</sub>-Konzentration in  $\mu\text{M}$  angegeben werden. Auch in der folgenden Betrachtung werden die Messergebnisse als Differenzwerte pro 10 Minuten ( $\mu\text{M}/10\text{min}$ ) präsentiert (siehe Abb. 4.14.).

Zu Versuchsbeginn wurden die Kaninchenlungen normoxisch ventiliert und gleichmäßig perfundiert. In dieser steady-state-Phase zeigte sich eine den anderen Versuchsreihen vergleichbare kontinuierliche intravasale NO<sub>x</sub>-Produktion um  $0,75 \mu\text{M}/10\text{min}$ .

Nach Beendigung der Ischämieperiode konnten mit der Reperfusion erneut intravasale Proben gewonnen werden. Unter den nun normoxischen Ventilationsbedingungen zeigte sich eine intravasale NO<sub>x</sub>-Produktion um  $0,6 \mu\text{M}/10\text{min}$ . Somit lagen die gemessenen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen nur marginal unter den Ausgangswerten.

Als Ergebnis ließ sich feststellen, dass die intravasale NO-Liberation analog der exhalativen NO-Messung auch nach einer Ischämieperiode unter vasalem Kollaps komplett wieder einsetzte. Die während der Ischämieperiode kollabierten Lungengefäße hatten somit keinen nachhaltigen Einfluss auf die NO-Emission nach Reperfusion (siehe Abb. 4.14.).



**Abb. 4.14.** Wiedereinsetzen der intravasalen  $\text{NO}_x$ -Produktion nach einer 90-minütigen anoxischen Ischämie bei fehlender vasaler Distension ( $n=5$ ).

Die Abb. 4.14. zeigt die intravasale  $\text{NO}_x$ -Freisetzung vor und nach einer 90-minütigen anoxisch ventilierten Ischämieperiode mit vasalem Kollaps. Zu Versuchsbeginn erfolgte analog den Versuchsreihen mit einer Ischämieperiode von 180 und 210 Minuten eine normoxische Ventilation und kontinuierliche Perfusion der Kaninchenlunge.

Der Kurvenverlauf verdeutlicht, dass die  $\text{NO}_x$ -Produktion unmittelbar nach der Reperfusion mit dem Wechsel des Beatmungsgases auf eine normoxische Zusammensetzung wieder einsetzte. Somit scheint der vasale Kollaps während der Ischämieperiode keinen nachhaltigen Einfluss auf die intravasale NO-Synthese bei Reperfusion auszuüben.

Die gezeigten Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt.  $n$  beschreibt die Anzahl der Versuche.

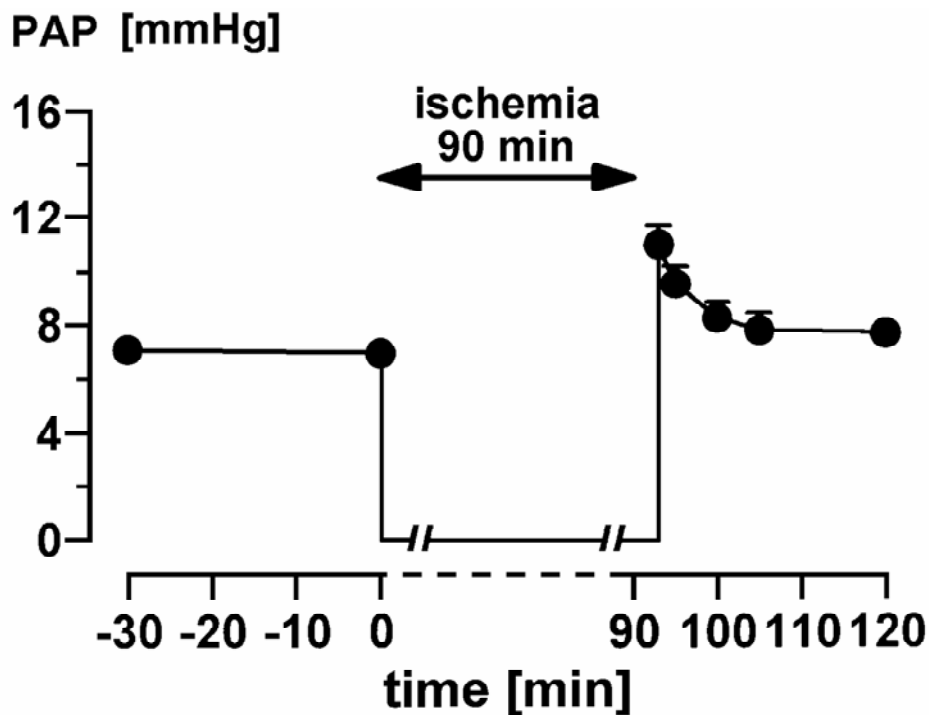
#### **4.2.3. Verlauf des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP), des mikrovaskulären Drucks, des kapillären Filtrationskoeffizienten (K<sub>fc</sub>), der Gewichtsretention sowie der Gefäßcompliance**

Während der steady-state-Phase ergab sich ein konstanter pulmonal-arterieller Druck (PAP) um 7 mmHg. Zu Ischämiebeginn wurde der intravasale Druck auf 0 mmHg eingestellt und verblieb auf diesem Wert bis zur Reperfusion. Bei Reperfusion kam es zu einem vorübergehenden Druckanstieg auf ein Maximum von 11,2 mmHg im Mittel. 30 Minuten nach erfolgter Reperfusion kehrte der PAP-Wert mit 8 mmHg wieder fast auf das Ausgangsniveau zurück (siehe Abb. 4.15.).

Die gemessenen mikrovaskulären Drücke waren vor Ischämiebeginn mit  $4,6 \pm 0,2$  mmHg den anderen Versuchsreihen vergleichbar. Unmittelbar nach Reperfusion (3-Minutenwert) kam es zu einem kurzzeitigen, leichten Anstieg auf  $6,5 \pm 0,4$  mmHg. Bereits 30 Minuten nach Reperfusion wurde wieder ein mikrovaskulärer Druck dem Ausgangsniveau entsprechend mit  $4,3 \pm 0,3$  mmHg bestimmt.

Postischämisch zeigte sich in dieser Versuchsreihe eine erhebliche Zunahme beim kapillären Filtrationskoeffizienten (K<sub>fc</sub>) und der Gewichtsretention: Der ermittelte K<sub>fc</sub>-Wert stieg im Mittel von rund 0,9 auf 9,3 [ $\text{cm}^3/\text{s} \cdot \text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{g} \cdot 10^4$ ] (siehe Abb. 4.16.), die Gewichtsretention verzeichnete einen gravierenden Zuwachs von 1,2 auf 25,1g. Die Gefäßcompliance fiel von 0,59 vor Ischämiebeginn während der 30 Minuten-Messung nach Reperfusion auf 0,45 ml/cmH<sub>2</sub>O.

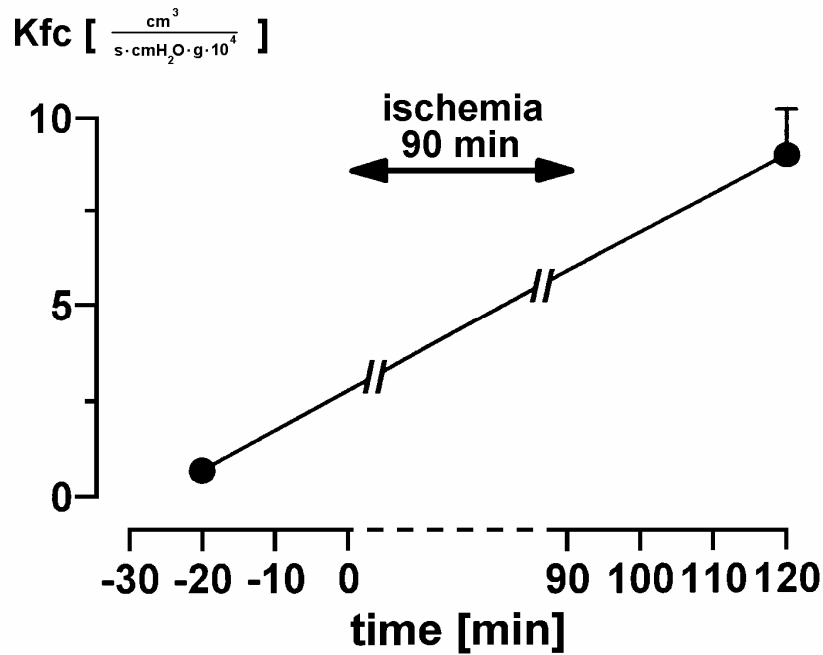
Nach Reperfusion trat ein so massives Lungenödem ein, dass die Versuche im Anschluss an die K<sub>fc</sub>-Messung abgebrochen werden mussten.



**Abb. 4.15.** PA-Druckverlauf bei Versuchen mit 90-minütiger anoxischer Ischämie (n=5).

Aufgezeigt in Abb. 4.15. ist der pulmonal-arterielle Druckverlauf vor und nach einer anoxisch ventilierten 90-minütigen Ischämieperiode bei fehlender vasaler Distension. Zum Zeitpunkt  $t=0$  begann die Ischämieperiode: Die Beatmung wurde von einem normoxischen Atemgas zu einem anoxischen Gasgemisch gewechselt und der intra-vasale Druck auf 0 mmHg eingestellt. Zu Ischämieende erfolgte die erneute Umstellung der Beatmung auf ein normoxisches Mischgas und die Reperfusion.

Die Gefäßdrücke werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben, die Anzahl der Versuche lag bei  $n=5$ . Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt.



**Abb. 4.16.** Messergebnisse des prä- und postischämischen kapillären Filtrationskoeffizienten nach einer 90-minütigen Ischämieperiode ohne erhaltenen positiven intravasalen Druck (n=5).

Anhand der Abb. 4.16. ist der deutlich eingetretene Gefäßschaden nach einer 90-minütigen anoxischen Ischämieperiode bei fehlendem positivem Gefäßdruck dargestellt. Die Messung erfolgte vor Ischämiebeginn und 30 Minuten nach Reperfusion. Die Messwerte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Fehlerbalken, die in das Versuchssymbol fallen, sind nicht dargestellt. n beschreibt die Anzahl der Versuche.



## 5. Diskussion der Ergebnisse

### 5.1. Einfluss von warmer Ischämie und konsekutiver Reperfusion auf die Integrität der isolierten Kaninchenlunge

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zum Ischämie-/ Reperfusionssyndrom der Lunge zeigten einen erheblichen Organschaden nach einer warmen Ischämie- und Reperfusionsphase. Dieser manifestierte sich in einer deutlichen Extravasation von Flüssigkeit und in der konsekutiven Ausbildung eines Lungenödems. Darüber hinaus war auch eine vorübergehende, begrenzte Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks zu verzeichnen. Der mikrovaskuläre Druck, der parallel zur Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ermittelt wurde, zeigte lediglich geringfügige Veränderungen, so dass die beobachtete Ödembildung auf eine schwere Schädigung der mikrovaskulären Barrierefunktion mit einer deutlich erhöhten Permeabilität zurückzuführen ist.

Das Ausmaß des Ischämie-/ Reperfusionsschadens hing von der An- oder Abwesenheit von Sauerstoff in der Ischämiephase ab: Unter einer anoxisch ventilierten Ischämieperiode kam es zu einer deutlicher ausgeprägten Schädigung des Organs als unter einer normoxisch ventilierten Ischämie. Weiterhin bewirkte der Zusatz des NO-Synthase Hemmers L-NMMA oder die Zugabe von Superoxid-Dismutase (SOD) im Rahmen der anoxischen Ischämieversuche eine deutliche Reduktion der K<sub>fc</sub>- und Retentionswerte. Die Bedeutung dieser Befunde im Kontext der pulmonalen NO-Synthese wird in den nachfolgenden Abschnitten näher erörtert.

Außerdem konnte aufgezeigt werden, dass die Ischämietoleranz des isolierten Organs stark abnahm, wenn in der Ischämieperiode kein positiver intravasaler Druck aufrechterhalten wurde. So zeigte sich, dass nach deutlich kürzeren Perioden von nur 90 Minuten anoxischer Ischämie bei fehlender vasaler Distension ein den 210 Minuten-Ischämieversuchen mit positivem intravasalem Druck vergleichbarer Permeabilitätsschaden zu erzeugen ist. Diese Befunde korrespondieren gut mit früheren Untersuchungen, wie z.B. von HAMVAS et al. [118] und SCHÜTTE et al. [119].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die Schwere der mikrovaskulären Schrankenstörung durch Modifikation der Bedingungen, die während der

ischämischen Phase vorherrschten, zu beeinflussen ist. Hierbei spielten neben der Länge der Ischämieperiode, die Zusammensetzung des im Ischämieintervall verwandten Atemgases – normoxisch oder anoxisch – sowie der vorherrschende Gefäßtonus (vasaler Kollaps oder Distension) eine entscheidende Rolle.

## **5.2. Einfluss von Ischämie-/ Reperfusion auf die NO-Liberation unter vasaler Distension in der Ischämiephase**

Ein Schwerpunkt dieser Untersuchung bestand darin, Aussagen zur NO-Synthese bei pulmonaler Ischämie und Reperfusion zu gewinnen. Im Kapitel 1.3.6. wurde bereits auf die rezeptorvermittelte Stimulation sowie die mechanischen Stimuli der NO-Synthase eingegangen (SCHILLING et al. [80], BUSSE et al. [81], WHITTLE et al. [78], KAROW und LANG-ROTH [79]) und es wurden die zelluläre NO-Synthese sowie die Signaltransduktion erläutert. Ebenso wurde der von EVANS et al. [82] und BUGA et al. [83] beschriebene Autoregulations-Mechanismus zur Regulation des Gefäßquerschnitts vorgestellt. Der Einfluss eines Ischämie- und Reperfusionsmanövers auf das NO-Synthese-Verhalten wurde bisher allerdings in der wissenschaftlichen Forschung nicht eingehend untersucht.

Mehrere Autoren, wie z.B. BARBOTIN-LARRIEU et al. [98], CHETHAM et al. [99], MURAKAMI et al. [100] und HERMLE et al. [16], konnten in ihren Untersuchungen den Organschaden durch eine exogene NO-Applikation reduzieren. Aus diesen Beobachtungen resultierte die Überlegung, dass das exogen zugeführte NO über die Absenkung des postischämischen Gefäßdrucks und des vaskulären Widerstands eine Reduktion des zu erwartenden Ischämieschadens bewirken könnte. Der Ischämieschaden hätte so in einer gestörten NO-Synthese während oder nach einer Ischämieperiode vermutet werden können. Andererseits gab es Beobachtungen, die die inhalative NO-Applikation als ineffektiv oder gar kontraproduktiv darstellten, so z.B. PINSKY et al. [97] und NAKA et al. [116]) (Näheres hierzu im Kap. 5.4.).

Die Hypothese einer Abhängigkeit des Permeabilitätsschadens vom PAP- oder dem mikrovaskulären Druck konnte bereits im Kapitel 5.1. auch ohne Betrachtung der NO-Daten für das blutfrei perfundierte Lungenmodell widerlegt werden.

Die NO-spezifischen Messparameter (Kap. 4.1.1. - 4.1.3.) belegen, dass ein Ischämie-/ Reperusionsmanöver unter den Bedingungen der vasalen Distension die NO-Synthesen nicht nachhaltig beeinträchtigt:

Versuchsreihen, in denen während der Ischämieperiode ein anoxisches Atemgas verwandt wurde, zeigten während dieser Phase keine weitere NO-Liberation. Jedoch kam es unmittelbar mit der Umstellung des Atemgases zurück zum normoxischen Gasgemisch bei der Reperfusion zum sofortigen Wiedereinsetzen der NO-Synthese, wie die Messungen im Exhalat sowie im Perfusat zeigen konnten.

Die fehlende NO-Liberation während der anoxischen Ischämieperiode war mutmaßlich auf das Fehlen von Sauerstoff, einem Substrat der NO-Synthese, zurückzuführen. Das Ischämieanöver per se ist nicht als Ursache der fehlenden NO-Synthese anzusehen, denn während der Versuchsreihen mit einer normoxisch ventilierten Ischämie kam es nicht zum Erliegen der NO-Synthese. Hier konnte im Gegensatz zur anoxischen Ischämie eine fortgesetzte NO-Exhalation dokumentiert werden. Diese wies eine leichte Reduktion von etwa 15 ppb im Exhalat im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Ischämie auf. Analog verhielt sich die im Perfusat gemessene Konzentration der NO-Abbauprodukte. Dieser  $\text{NO}_x$ -Kumulativbefund, der die Ischämieperiode erfasste, erreichte während einer normoxisch ventilierten Ischämieperiode in etwa die Hälfte des Kontrollgruppenniveaus. Mit der Reperfusion kam es auch in dieser Versuchsgruppe zum sofortigen Anstieg der NO-Syntheseleistung auf das Niveau der Kontrollgruppe.

Diese Beobachtungen waren u.a. daher von besonderem Interesse, da die vaskulären Scherkräfte als wesentlicher Stimulus der Endothelzellen zur basalen NO-Synthese verantwortlich gemacht wurden. Unter „Flowstop“-Bedingungen während der Ischämiephase kommt es naturgemäß zum Erliegen des pulsativen Flusses und somit zum Verlust der vaskulären Stimuli. Da jedoch eine fortbestehende und nicht unerhebliche NO-Exhalation in diesen Untersuchungen offenkundig wurde, ist zu vermuten, dass die durch die Ventilation verursachten Scherkräfte die basale NO-Synthese ebenfalls zu triggern vermögen. Bestätigt fand sich diese Vermutung in bisher unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe SCHÜTTE. Hier konnte aufgezeigt werden, dass die Variation der Beatmungsparameter sogar einen noch größeren Einfluss auf die NO-Liberation aufwies, als die Veränderung von Pulsationsfrequenz oder Volumenfluss des Perfusats.

Insgesamt ließ sich aufzeigen, dass ein Ischämie-/ Reperfusionereignis die pulmonale NO-Liberation nicht nachhaltig beeinträchtigt. Es kam allerdings während einer Ischämieperiode unter normoxischen Bedingungen zu einer reversiblen Reduktion der Syntheseleistung und unter anoxischen Bedingungen zu einem kompletten, aber ebenfalls vollständig reversiblen Verlust der NO-Synthese. Diese Ergebnisse konnten übereinstimmend im Perfusat und im Exhalat erhoben werden. Die Variation der Ischämiezeit hatte keinen qualitativen Einfluss auf diesen Befund.

### **5.3. Einfluss eines während der Ischämie bestehenden vasalen Kollaps auf die NO-Liberation**

In Ergänzung zu den zuvor diskutierten Ergebnissen, die nach einer 180- und 210-minütigen Ischämie bei erhaltenem positiven intravasalen Druck keine dauerhafte Beeinträchtigung der NO-Synthese aufwiesen, wurde zusätzlich untersucht, ob sich diese Beobachtung auch nach einer Ischämieperiode mit kollabierten Gefäßen feststellen ließ.

Die Vorstellung, dass es während des vasalen Kollaps durch das Aufeinanderliegen der Endothelschichten zur mechanischen Schädigung der Endothelzellen kommt, auf diese Weise die NO-produzierenden Zellen geschädigt werden und so die Regulation der NO-Synthese nachhaltig gestört werden könnte, ist zunächst naheliegend. Darin könnte auch die deutlich reduzierte Ischämietoleranz eines ischämischen Organs mit kollabierten Gefäßen erklärt werden. Allerdings scheint es nicht zu einer nachhaltigen Verminderung der NO-Synthese zu kommen, wie aus dem Ergebnisteil (Kap. 4.2.) hervorgeht: In der Versuchsreihe 90 Minuten anoxische Ischämie bei vasalem Kollaps kam es mit dem Wechsel vom normoxischen zum anoxischen Atemgas zu Ischämiebeginn zum vollständigen Erliegen der NO-Liberation. Diese Tatsache entsprach dem bekannten Szenario der anoxischen Ischämieversuche mit 180 und 210 Minuten Länge bei erhaltener vasaler Distension. Ebenfalls setzte auch in dieser Versuchsreihe mit periischämisch kollabierten Gefäßen - analog den Ischämieversuchen bei erhaltener vasaler Distension - die NO-Synthese unmittelbar mit der Reperfusion und der parallel erneuten Reoxygenierung des Atemgases wieder ein. Diese Beobachtungen konnten übereinstimmend im Exhalat und in der Perfusatanalyse nachgewiesen werden.

Somit ist gezeigt, dass sich die NO-Synthese, unabhängig von der An- oder Abwesenheit eines periischämischen intravasalen Drucks, nicht nachhaltig durch ein Ischämiemanöver beeinträchtigen lässt. Folglich ist der protektive Effekt eines erhaltenen intravasalen Drucks während einer Ischämieperiode nicht auf die postischämisch erhaltene Funktion der NO-Synthasen zurückzuführen. Aufgrund dieser Beobachtung muss ein NO-unabhängiger Mechanismus in der Strategie der „Biophysikalischen Protektion“ angenommen werden.

Diese Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu den Ergebnissen von BECKER et al. [120]. Sie beschrieben zwar einen ähnlich protektiven Effekt durch einen erhaltenen positiven intravasalen Druck bei der Entstehung des Ischämieschadens an Iltis-Lungen, jedoch konnten sie diesen Effekt durch die Zugabe des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME unterdrücken. Somit vermuteten die Autoren eine bedeutsame Beteiligung der NO-Freisetzung im Rahmen des Ischämie-/ Reperfusionssyndroms. Allerdings basierten BECKERS Ergebnisse auf Versuche mit hyperoxisch ventilierten und nicht reperfundierten Iltis-Lungen. Möglicherweise bezogen diese Versuche einen andersartigen Schädigungsmechanismus ein, der von dem der vorliegenden Arbeit differiert.

#### **5.4. Zusammenhang zwischen der NO-Liberation und dem Ischämie-/ Reperfusionsschaden**

Die Rolle des endogen produzierten NOs in Bezug auf die Ausprägung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens stellt sich kontrovers dar: Einerseits zeigte die Blockierung der NO-Synthase in mehreren Ischämie-/ Reperfusionsmodellen einen positiven Effekt (FLÖGEL et al. [112], YU et al. [113], PHAN et al. [114], NISHIKAWA et al. [115] und MATHEIS et al. [146]), andererseits bescheinigten Studien von SATO et al. [105], WILLIAMS et al. [106], MASINI et al. [107], COTTART et al. [108], IWATA et al. [109] und KUBES und GRANGER [110] einen nachteiligen Einfluss. Nachgewiesen ist, dass NO sowohl protektive als auch toxische Wirkungen entfalten kann: Protektive Effekte sind im Rahmen des pulmonalen Ischämie-/ Reperfusionsschadens eine NO-vermittelte Vasodilatation, eine Verminderung des postischämischen PA-Druckanstiegs, eine Verringerung des Ventilations-Perfusions Missverhältnisses und

des Shuntflusses, antiinflammatorische Effekte sowie eine Schutzfunktion für die alveolo-epitheliale Barriere durch antioxidative Mechanismen („Radikalfänger“) oder eine Reduktion der Leukozytenaktivierung und –adhäsion. Allerdings kann NO dosisabhängig auch nachteilige, toxische Effekte vermitteln und z.B. als Radikal selbst Alveolarzellen schädigen. Des Weiteren vermuten BECKMAN und KOPPENOL [147] sowie McCORD [148] die Entstehung von toxischem Peroxinitrit und anderen toxischen Folgeprodukte aus der Verbindung von NO und Superoxidanionen (hierzu mehr in Kap. 5.5.).

Nachdem in den vorangestellten Kapiteln aufgezeigt werden konnte, dass ein Ischämie-/ Reperfusionseignis nicht grundsätzlich die Funktion der NO-Synthasen schädigt, stellte sich die Frage, in welcher Beziehung die Präsenz von NO zum zu erwartenden Organschaden steht.

Aus den gezeigten Versuchen lässt sich ableiten, dass nach einer anoxisch ventilierten Ischämieperiode der ausgeprägteste Ischämie-/ Reperfusionsschaden resultiert. Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass es in dieser Versuchsreihe während der anoxisch beatmeten Ischämie zu keiner NO-Liberation kam. Mit der Umstellung des Atemgasgemisches zurück zum normoxischen Gas setzte die NO-Synthese allerdings prompt und vollständig wieder ein. Im Vergleich hierzu wurde in den Versuchsreihen mit einer oxisch ventilierten Ischämieperiode eine erhaltene, wenn auch leicht reduzierte NO-Produktion dokumentiert. Diese Beobachtung erbrachte die Vermutung, dass der postischämische Organschaden eventuell durch die Verfügbarkeit von NO während der Ischämieperiode getriggert werden könnte. Gestützt wurde diese Überlegung z.B. durch die Ergebnisse von WILLIAMS et al. [106], der nach einer induzierten Koronarischemie an Kaninchenherzen eine Abhängigkeit der myokardialen Infarktgröße von der endogenen NO-Produktion beschrieb: Nach Blockade der NO-Synthasen mit L-NA (L-Nitro-Arginin) kam es zu einer deutlichen Zunahme der Infarktgröße. Aus diesem Grund wurde ein kardioprotektiver Effekt im Fortbestand der endogenen NO-Produktion vermutet. Gleichlautende Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen von SATO et al. [105] an Hundeherzen. Hierbei wurde die Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion durch die Verwendung von Kardioplegielösungen, die L-NA (L-Nitro-Arginin) als NO-Synthase-Blocker enthielten, deutlich gesteigert. Daraufhin vermuteten die Autoren, dass eine fortwährende NO-Produktion kardioprotektive Effekte bewirken könnte. Hierzu passend postulierte MASINI et

al. [107] protektive Effekte der endogenen NO-Synthese nach einer induzierten, zeitlich begrenzten Koronarischämie mit anschließender Reperfusion an isolierten Schweineherzen. Die experimentelle Blockade der NO-Synthasen durch L-NMMA und L-NAME konnte die Gewebsschäden an den Myokardzellen erhöhen, während die Medikamentengabe von Nitroprussid, als NO-Donator, die beobachtete Schädigung reduzierte. Aus diesen Ergebnissen wurde ein protektiver Effekt im Fortbestand der endogenen NO-Synthese während der Ischämiephase abgeleitet. Weiterhin wurden gleichlautende Aussagen von IWATA et al. [109] geschildert, die Ischämie-/ Reperfusionsuntersuchungen an der Rattenmagen-Mukosa durchführten. Medikamentöse Blockade der NO-Produktion durch L-NAME und L-NMMA konnte hier eine signifikante Steigerung des Mukosaschadens nach Reperfusion aufzeigen, während eine anhaltende NO-Produktion dies vermied. Somit kam IWATA ebenfalls zu dem Schluss, dass ein Fortbestand der endogenen NO-Synthese ein wichtiger protektiver Faktor zur Prävention des Ischämie-/ Reperfusionsschadens sei. KUBES und GRANGER [110] konnten auch ohne eine Ischämiephase einen postkapillären Gefäßschaden an den Venolen des Katzendünndarms durch die Inhibition der NO-Synthasen mittels L-NAME auslösen. Die induzierte Permeabilitätsstörung war hierbei z.T. durch eine anschließende Nitroprussid-Gabe reversibel. Somit wurde auch hier auf einen protektiven Effekt in der Aufrechterhaltung der endogenen NO-Synthese geschlossen. COTTART et al. [108] untersuchten den Ischämie-/ Reperfusionsschaden an der Rattenleber. Auch diese Ergebnisse wiesen einen protektiven Einfluss im Fortbestand der endogenen NO-Synthese beim Ischämie-/ Reperfusionsschaden der Leber- und Endothelzellen auf. Der protektive Einfluss wurde hier nicht alleine der gefäßdilatierenden Wirkung des NOs zugeschrieben, da eine Imitation dieses Effekts durch Guanosin-Applikation - ein Monophosphat-unabhängiger Vasodilatator - nicht die selbe protektive Wirkung erzielen konnte.

Um weiteren Aufschluss in dieser Frage zu erhalten, wurde in dieser Arbeit in normoxischen Ischämieversuchen die NO-Synthese mit Hilfe des NO-Synthase Inhibitors L-NMMA blockiert. Auf diese Weise sollte für die NO-Synthese unter normoxischen Bedingungen eine anoxische Ischämie imitiert werden. Erstaunlicherweise erbrachte die Blockade der NO-Synthese während der Ischämie keinen nennenswerten Effekt im Vergleich zur normoxischen Versuchsgruppe ohne L-NMMA. Es zeigten sich hierbei vergleichbare Messwerte für K<sub>fc</sub> und Gewichtsretention. Dass eine suffiziente

Blockade der NO-Synthase vorlag, dokumentierten die Messwerte des exhalativen NOs. Hier zeigte sich ein prompter und dauerhafter Abfall der NO-Liberation (siehe Abb. 4.1., 4.2. und 4.13.). Ebenfalls zeigte die Auswertung der NO-Abbauprodukte ( $\text{NO}_x$ ) im Perfusat eine fast vollständig eingestellte NO-Synthese nach Applikation von L-NMMA (siehe Abb. 4.3.-4.6. und 4.14.). Vor dem Hintergrund o.g. Publikationen wäre eine deutliche Aggravierung des Reperfusionsschadens bei ansonsten gleichartigen Bedingungen denkbar gewesen.

Zur Erklärung dieses eher überraschenden Befundes kamen zwei Gedankenansätze zum Tragen:

Zum einen bestand im hier angewandten, isoliert perfundierten in vitro-Lungenmodell eine entscheidende Besonderheit, die dieses Modell von anderen Organmodellen unterschied. Im Modell der isolierten Kaninchenlunge bestand die Möglichkeit einer normoxischen Ventilation während einer Ischämieperiode. Daher bedeutet eine Ischämie nicht notwendigerweise eine Anoxie des abhängigen Gewebes, wie es z.B. in den Organmodellen der o.g. Autoren der Fall war. Erfolgte allerdings im Modell der isolierten Lunge während der Ischämiephase eine anoxische Ventilation, so ähnelte dies den ischämischen Bedingungen anderer Organmodelle, da auf diese Weise eine komplette Gewebsanoxie entstand.

Zum anderen schien der protektive Effekt einer normoxisch ventilierten Ischämieperiode nicht ausschließlich dem Fortbestand der NO-Synthese zuzuschreiben zu sein, sondern musste in der Anwesenheit von Sauerstoff mitbegründet sein. Denn in Bezug auf das NO-Syntheseverhalten bestand zwischen der anoxischen Versuchsreihe und der oxischen mit L-NMMA ein entscheidender Unterschied: Im Gegensatz zur oxischen Ischämie unter Verwendung von L-NMMA und der darin begründeten anhaltenden Suppression der NO-Synthese wurde in der anoxischen Versuchsreihe nach einer anoxischen Ischämie das Atemgas zur Reperfusion wieder zur Normoxie gewechselt. Somit setzte die NO-Synthese wieder ein.

Um zu klären, ob man einerseits beim isolierten Kaninchenlungenmodell zwischen einem Modell der normoxischen und einem der anoxischen Ischämie unterscheiden muss und ob andererseits ein möglicher Nachweis über einen Zusammenhang zwischen der wiedereinsetzenden NO-Synthese nach einer anoxischen Ischämie und dem zu erwartenden Schaden aufzuzeigen war, wurden nun Versuche mit einer an-



oxischen Ischämie unter Zugabe von L-NMMA durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass eine suffiziente Blockade der NO-Synthese über den Zeitpunkt der Reperfusion und damit der Reoxygenierung hinaus einen deutlich protektiven Effekt ergab. Kfc und Gewichtsretention wiesen Messwerte vergleichbar der normoxischen Ischämie mit oder ohne L-NMMA Applikation auf. Im Vergleich zur anoxischen Ischämie mit einer normoxischen Reperfusion sanken unter dem Einfluss von L-NMMA Kfc-Wert und Gewichtsretention um mehr als die Hälfte.

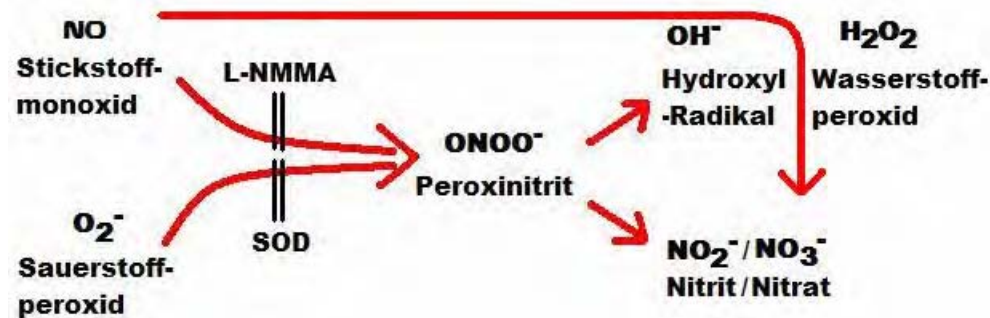
Somit konnte zum Einen gezeigt werden, dass in der Tat im Modell der isoliert perfundierten Kaninchenlunge zwischen einer anoxisch und einer normoxisch ventilierten Ischämie unterschieden werden muss. Denn die Applikation von L-NMMA vor der anoxischen Ischämie vermochte den postischämischen Permeabilitätsschaden deutlich senken.

Zum Anderen stellte sich jedoch die Frage, aus welchem Grund es im Anschluss an eine anoxische Ischämie nach Reperfusion und Reoxygenierung und dem Wiedereinsetzen der NO-Synthese zu einer so deutlichen Potenzierung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens kam. Ein Zusammenhang ließ sich in der Reaktion zwischen dem wieder eintreffenden Sauerstoff und der wiedererwachten NO-Synthese vermuten. Ein möglicher Zusammenhang soll daher im folgenden Kapitel beleuchtet werden.

### **5.5. Mögliche Beziehungen zwischen der Anwesenheit von Sauerstoff, der NO-Liberation und der Generation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Genese des Ischämie-/ Reperfusionsschadens**

Die Beobachtung, dass es im Anschluss an eine anoxische Ischämieperiode mit der Reoxygenierung und dem Wiedereinsetzen der NO-Synthese zu einer eindrucksvollen Permeabilitätsstörung der Lunge kam, die sich in der Ausprägung durch die Blockade der NO-Synthese durch L-NMMA deutlich reduzieren ließ, deutete auf einen Zusammenhang zwischen der Sauerstoffpräsenz und der NO-Verfügbarkeit hin. Möglicherweise ergab sich der nachteilige Effekt der wiedereinsetzenden NO-Synthese im Zusammenspiel mit dem wieder verfügbaren Sauerstoff und der Bildung von Sauerstoffsuperoxid nach oxischer Reperfusion eines zuvor ischämischen Or-

gans. BECKMAN und KOPPENOL [147] publizierten die Möglichkeit der Entstehung von Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) durch weitere Reaktion aus Sauerstoffsuperoxid ( $\text{O}_2^-$ ) und Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ). Peroxinitrit kann in der Folge zu zytotoxischen Hydroxyl-Sauerstoffradikalen ( $\text{OH}^\cdot$ ) und Stickstoffdioxiden ( $\text{NO}_2^-$ ) reagieren (siehe Abb. 5.1.).



**Abb. 5.1.** Chemische Reaktionen des Stickstoffmonoxids.

Abb. 5.1. zeigt Generationsmöglichkeiten von Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ) und Sauerstoffperoxid ( $\text{O}_2^-$ ) zu Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) sowie einiger Folgeprodukte.

*N*-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) ist ein NO-Synthasen-Hemmer; Superoxid-Dis-mutase (SOD) dismutiert enzymatisch Sauerstoffperoxid.

Ebenso zeigte McCORD [148], dass Superoxid-Verbindungen unter den Bedingungen der Anoxie-Reoxygenierung entstehen konnten, wenn ischämisches Gewebe erneut mit Sauerstoff aufgesättigt wurde. Wie bereits aus der Übersicht zum Stand der Forschung im Kapitel 1.3.2. und 1.3.5. hervorgeht, werden den reaktiven Sauerstoffspezies eine Vielzahl von Schädigungsmechanismen zugesprochen. Diese reichen dosisabhängig von der Zellyse, der Provokation von DNS-Schäden, der Lipidperoxidation, der Schädigung zellulärer Membranenzyme über die Einschränkung der alveolaren Surfactant-Biosynthese bis zum Einfluss auf die aktiven Flüssigkeits- und Ionentransporte sowie der Zelladhäsionskomplexe in den Alveolarzellen. Autoren wie ROSE et al. [15], KHIMENKO et al. [63], PITTET et al. [67] und SATO et al. [105] sehen eine wesentliche Ursache der postischämisch gestörten alveolo-epithelialen Schrankenfunktion als Folge des Einflusses von Radikalen oder in der Störung antioxidativer Schutzmechanismen.

Um weiteren Aufschluss über die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies zu erhalten, sollte in der Versuchsreihe anoxische Ischämie mit Applikation von Superoxid-Dismutase (SOD) zur Reperfusion untersucht werden, ob sich der Ischämie-/ Reperfusionsschaden mit Hilfe dieses Enzyms begrenzen ließ. Tatsächlich konnte eine deutliche Reduktion des Permeabilitätsschadens im Vergleich zur anoxischen Ischämie nachgewiesen werden. Somit passen die Ergebnisse dieser Arbeit gut zu denen von YASMIN et al. [149] aus Studien an isolierten Rattenherzen. Hier wurde im Zusammenspiel von NO und Superoxid Anion ( $O_2^-$ ) die Entstehung von Peroxinitrit ( $ONOO^-$ ) während der Reperfusion beschrieben. Die durch Peroxinitrit mutmaßlich vermittelten Ischämie-/ Reperfusionsschäden konnten in jenem Modell, in Analogie zu dieser Arbeit, zum einen durch die Blockade der NO-Synthese (durch Gabe von L-NMMA) und zum anderen durch Antagonisierung der reaktiven Sauerstoffspezies (durch die Applikation von S-nitroso-N-acetyl-penisillamine, SNAP) deutlich reduziert werden.

Die Vermittlung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens durch die Generation von Peroxinitritverbindungen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies aus Sauerstoffsuperoxid und NO konnte im verwandten Modell noch nicht im Detail belegt werden, doch unterstreichen die erbrachten Ergebnisse die von anderen Arbeitsgruppen formulierten Hypothesen.

## 5.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit beleuchtet insbesondere das NO-Liberationsverhalten bei pulmonaler Ischämie und Reperfusion. Es konnte aufgezeigt werden, dass die An- oder Abwesenheit des über die Atemwege bereitgestellten Sauerstoffs einen entscheidenden Einfluss auf die Produktion des endogenen NOs und die Ausprägung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens hatte.

Es konnte während der normoxisch beatmeten Ischämie-Lungen kein Hinweis dafür gefunden werden, dass endogen synthetisiertes NO die Entstehung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens triggert. Eine komplette Suppression der NO-Synthese während der oxischen Ischämie- und Reperfusionperiode durch L-NMMA beeinflusste die

Schwere des Permeabilitätsschadens nicht. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung Ausdruck einer „balancierten Summe“ zwischen „protektiven“ NO-Effekten zurzeit der Ischämie und „nachteiligen“ NO-Wirkungen war, die sich erst nach Reperfusion manifestierten.

In periischämisch anoxisch ventilierten Lungen kam es mit erneuter Reoxygenierung bei Reperfusion zu einem beeindruckenden Permeabilitätsschaden. Eine Blockade der NO-Synthasen durch L-NMMA konnte im Vergleich hierzu einen deutlich protektiven Effekt erzielen. HUANG et al. [150] beschrieben eine ähnliche Reduktion des Lungenschadens durch die Inhibition der NO-Synthase unter anoxischen Ischämie-/ Reperfusionsbedingungen, wenngleich in der Veröffentlichung nicht ausdrücklich die vaskuläre Permeabilität adressiert wurde. Anhand der hier präsentierten Ergebnisse lässt sich vermuten, dass der positive Effekt der NO-Synthese-Inhibition während der anoxischen Ischämieversuche auf die Reperfusionsphase begrenzt war, denn die endogene NO-Synthese kam ohnehin aufgrund des fehlenden Sauerstoffs während der Ischämieperiode zum Erliegen. Allerdings setzte diese unmittelbar mit dem Wechsel des Atemgases zum normoxischen Beatmungsgas zur Reperfusion wieder ein.

Die hier beschriebene Differenz zwischen der anoxisch und der normoxisch ventilierten Ischämie unterstreicht eine Besonderheit dieses Versuchsmodells. Eine Ischämieperiode bedeutet am Kaninchenlungen-Modell nicht zwingend eine Gewebsanoxie, wie es bei den häufig untersuchten Versuchmodellen an Herz, Darm oder Nieren der Fall ist. Die Befunde dieser Organmodelle sind am Ehesten der Versuchsanordnung einer anoxisch ventilierten Lunge vergleichbar. ZHAO et al. [151] lieferten so auch in ihrer Publikation den Nachweis dafür, dass unterschiedliche Generationswege für die Entstehung von pulmonalen reaktiven Sauerstoff-Verbindungen im Ischämie-/ Reperfusionskomplex und im Anoxie-/ Reoxygenierungs-Komplex verantwortlich sind.

Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass der positive Effekt der fortgesetzten Ventilation und der vasalen Distension unter Ischämie nicht mit der Aufrechterhaltung der endogenen NO-Synthese während der Ischämie-Periode in Verbindung gebracht werden kann.

Letztlich konnte ebenfalls in anoxischen Ischämieversuchen nach Zugabe von SOD zum Perfusat unmittelbar zur Reperfusion ein protektiver Effekt erzielt werden. Dieser zeigte ein vergleichbares Ausmaß wie die Versuche mit einer anoxischen Ischämie und Applikation von L-NMMA sowie den oxischen Ischämieversuchen. Die Erkenntnisse unterstreichen die Hypothese, dass das Wiedererscheinen von NO und ein Auftreten von Superoxid-Verbindungen während des Wiedereintreffens von Sauerstoff ins System den Weg zur Bildung von Peroxynitrit bereitet und es so zur Bildung verschiedener toxischer Reaktionsprodukte kommen kann. Diese Sichtweise steht im Einklang mit Beobachtungen von YASMIN et al. [149] an isolierten Rattenherzen. Sie beschrieben das intravasale Erscheinen von Peroxynitrit-Verbindungen nach einer Ischämieperiode während der Reperfusion. Wie bereits im vorangestellten Kapitel erwähnt, kann Superoxidanion in der Reaktion mit Stickstoffmonoxid zu Peroxinitrit bzw. Peroxinitritsäure reagieren ( $\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$ ). Diese Reaktion verläuft etwa dreimal schneller als der enzymatische Abbau von Superoxidanion mit Hilfe der Superoxid-Dismutase (SOD). Diese Tatsache könnte erklären, weshalb der Einsatz von SOD in der vorgestellten Arbeit keinen noch deutlich protektiveren Effekt erzielen konnte. Vermutlich konnte nach Reoxygenierung und erneut vollständig angelaufener NO-Synthese nur ein begrenzter Anteil des anfallenden Superoxids durch SOD abgebaut werden, während noch eine wirksame Menge mit NO zum Peroxinitrit reagierte. Inwieweit diese Vermutung in dem komplexen Zusammenspiel des Ischämie-/ Reperfusionsschadens zutrifft, war zwar nicht Frage dieser Arbeit, sollte jedoch genauer untersucht werden.

Zu Bedenken ist, dass eine alleinige Blockade der NO-Synthese zur Begrenzung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens auch potentiell positive NO-Effekte verhindern könnte, die weniger im hier vorgestellten Modell, aber ggf. in vivo relevant werden könnten. Hier wären u.a. die pulmonale Vasodilatation, der antioxidative Effekt (Radikalfänger) und die Reduktion der Leukozytenaktivierung und –adhäsion zu erwähnen.

Aus den hier vorgestellten Daten lässt sich kein unmittelbarer Rückschluss auf einen potentiellen Nutzen einer exogenen NO-Applikation ziehen. Separate Untersuchungen am hier eingesetzten Ischämie-/ Reperfusionsmodell zeigten allerdings protektive Effekte durch exogen zugeführtes, inhalatives NO (SCHÜTTE et al. [157]). Ebenso wurde durch andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass inhalatives NO einen

protektiven Effekt haben kann (BARBOTIN-LARRIEU et al. [98], CHETHAM et al. [99], MURAKAMI et al. [100], HERMLE et al. [16]). Allerdings wurde durch die NO-Inhalation auch ein fehlender Schutzeffekt von NAKA et al. [116] beschrieben, und EPPINGER et al. [152] berichteten sogar von einer Progredienz der Ödembildung.

Zusammenfassend kann zum Einen das Timing, zum Anderen aber auch die Dosierung des exogen applizierten NOs der kritische Punkt in diesem Zusammenhang sein. Zusätzlich spielt vermutlich die räumliche Verteilung des inhalierten NOs eine Rolle, die zwischen dem endogen synthetisierten und dem exogen zugeführten erheblich differieren kann. Auf diese Weise wären auch unterschiedlich beschriebene Wirkprofile zu erklären.

## 6. Zusammenfassung

Die mikrovaskuläre Hyperpermeabilität mit konsekutiver Ödembildung ist ein wesentliches Charakteristikum des pulmonalen Ischämie-/ Reperfusionssyndroms, wie in verschiedenen Modellen und in unterschiedlichen Spezies gezeigt werden konnte. Klinisch kann es hierdurch zum Bild des akuten Lungenversagens kommen. Die Rolle der endogenen NO-Synthese bei der Entstehung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens der Lunge war bisher unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kaninchenlungen isoliert perfundiert und ventiliert und einer warmen Ischämieperiode unterzogen. Der spezifische Versuchsaufbau ermöglichte neben der Erfassung der pulmonalen Hämodynamik und der endothelialen Permeabilität die kontinuierliche Messung der exhalativen NO-Liberation sowie der intravasalen Akkumulation der NO-Abbauprodukte ( $\text{NO}_x$ ).

Die pulmonale NO-Produktion wurde in Versuchsreihen mit einer Ischämieperiode von 180 und 210 Minuten Länge unter normoxischer und anoxischer Ventilation und vasaler Distension (einem aus Voruntersuchungen bekannten Protektionsprinzip) erfasst. Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die Blockade der endogenen NO-Synthese durch L-NMMA im Rahmen einer normoxisch sowie einer anoxisch ventilierten Ischämieperiode auf die Ausbildung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens hatte. Zusätzlich wurde der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Anschluss an eine anoxisch ventilierte Ischämieperiode durch die Applikation von Superoxid-Dismutase (SOD) ermittelt. Um Unterschiede der NO-Synthese zwischen einer Ischämieperiode unter vasaler Distension und vasalem Kollaps zu bestimmen, wurde das Organ in weiteren Experimenten einer 90-minütigen, anoxisch ventilierten Ischämie bei vasalem Kollaps ausgesetzt.

Die Auswertung der Versuchsdaten ergab während einer normoxisch ventilierten Ischämie einen leichten Abfall der NO-Synthese, der unmittelbar nach Reperfusion auf das Ausgangsniveau zurückkehrte, bei einem moderatem Ischämie-/ Reperfusionsschaden. Die Blockade der NO-Synthese durch L-NMMA unter diesen Bedingungen modifizierte den postischämischen Permeabilitätsschaden nicht wesentlich.

Nach einer anoxisch ventilierten Ischämieperiode zeigte sich ein deutlich gravierender Ischämie-/ Reperfusionsschaden mit einer ausgeprägten Erhöhung der kapillä-

ren Filtration. Während der Ischämieperiode kam es zu einer vollständigen Suppression der NO-Liberation. Mit erneuter Reoxygenierung zur Reperfusion setzte die NO-Synthese allerdings prompt und vollständig wieder ein. Überraschenderweise ließ sich der Ischämie-/ Reperfusionsschaden in dieser Versuchsreihe durch die anhaltende Inhibition der NO-Synthese durch L-NMMA deutlich reduzieren.

Weiterhin reduzierte die Applikation von SOD die durch eine anoxische Ischämie hervorgerufene Permeabilitätsstörung. Auch hierbei kam es zum prompten Wiedereinsetzen der NO-Liberation mit der Reoxygenierung zur Reperfusion.

Versuche mit einer 90-minütigen anoxischen Ischämie bei fehlendem positivem intravasalem Druck zeigten, dass auch nach einem vasalen Kollaps die NO-Synthese mit der Reoxygenierung zur Reperfusion umgehend wieder einsetzt.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit aufzeigen, dass

- unter einer normoxischen Ischämie kontinuierlich NO produziert wird, und der Ischämie-/ Reperfusionsschaden unter diesen Bedingungen durch endogen synthetisiertes NO weder getriggert noch abgemildert wird.
- die unter anoxischer Ischämie supprimierte endogene NO-Synthese mit Reoxygenierung und Reperfusion wieder vollständig einsetzt und dies möglicherweise über die Interaktion mit Sauerstoffperoxid zur Entstehung der vaskulären Hyperpermeabilität beiträgt.
- die pulmonale NO-Synthese nach einem Ischämie-/ Reperfusions-Manöver unter vasalem Kollaps unbeeinträchtigt bleibt und somit der protektive Effekt einer vasalen Distension während einer Ischämieperiode offenbar nicht durch NO vermittelt wird.

Diese Erkenntnisse können möglicherweise für eine Verbesserung der Präservierung von Spenderorganen nutzbar sein.



## 7. Summary

Various studies in different species have shown that loss of capillary barrier properties with subsequent pulmonary oedema formation plays an important role in lung ischemia/reperfusion injury. The exact role of endogenous nitric oxide (NO) in this scenario still needs to be clarified.

In the current study, isolated buffer-perfused rabbit lungs have been ventilated and exposed to a warm ischemia/reperfusion manoeuvre. Measurements of pulmonary haemodynamics and endothelial permeability were performed. Additionally, allowed by a specific experimental setting, measurement of exhalative NO release and intravascular accumulation of NO degradation products (NO<sub>x</sub>) was conducted. The measurements were performed in test series with 180 and 210 minutes of ischemia under both normoxic and anoxic ventilation and vascular distension.

The influence of L-NMMA-mediated endogenous NO synthesis blockade on the generation of ischemia/reperfusion injury was investigated. The effect of reactive oxygen species (ROS) and the impact of superoxid dismutase (SOD)-application on the ischemia/reperfusion injury following an anoxic ventilated ischemia period were evaluated as well.

Additionally, the effect of vascular distension and vascular collapse on the NO-synthesis during and after 90 minutes of ischemia under anoxic ventilation was examined.

Results: During normoxic ventilated ischemic periode with vascular distension the NO synthesis was only marginally reduced. After reperfusion the NO synthesis fully recovered, paralleled by a moderate leakage response (increase in capillary filtration coefficient). After NO synthesis blockade with L-NMMA, the NO release was nearly completely inhibited whereas the leakage response remained unchanged.

After an anoxic ventilated ischemia period severe ischemia/reperfusion injury was observed and massive vascular leakage was detected. During the anoxic ventilated ischemic period, NO release was nearly completely suppressed, but re-appeared immediately upon reperfusion and ventilation with normoxic gas. Surprisingly, the inhibition of NO synthesis by L-NMMA reduced the ischemia/reperfusion injury substantially.

Moreover, the vascular leakage after an anoxic ventilated ischemic period could also be reduced by application of SOD. Under these conditions, the NO synthesis recovered promptly upon changing to normoxic ventilation.

Experiments with 90 minutes of anoxic ventilated ischemia and vascular collapse showed that NO-synthesis immediately recovered upon changing the ventilation to normoxic gas as well.

In summary, the current study demonstrates that

- NO is continuously synthesized during normoxic ischemia period and does not induce or mitigate the severity of ischemia/reperfusion injury under these conditions.
- endogenous NO synthesis is suppressed during anoxic ischemia, but recovers promptly upon reperfusion and reoxygenation. This reappearance of endogenous NO apparently triggers vascular leakage upon reperfusion, possibly through its interaction with oxygen radical production.
- pulmonary NO synthesis after an ischemia/reperfusion manoeuvre is not influenced by vascular collapse during the ischemic period. Therefore, the protective effect of vascular distension during ischemia is most likely not NO-mediated.

**Abbildungsverzeichnis:**

- Abb. 1.1. Vereinfachte schematische Darstellung des L-Arginin/NO-Stoffwechsels.
- Abb. 1.2. Wirkmechanismus von organischen Nitraten, Molsidomin, Nitroprussid-Natrium und EDRF. Quelle: Eigener Entwurf in Anlehnung an [68]
- Abb. 3.1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung und der Position der Messanalytik.
- Abb. 3.2. Schematischer Druckverlauf während eines „Double-Clamping“-Manövers. Quelle: Dissertationsarbeit von Dr. med. R. Voswinkel 2000 [154]
- Abb. 3.3. Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des  $K_{fc}$ 's, der vaskulären Compliance und der Retention.
- Abb. 3.4. Gasfluss-Diagramm des Chemilumineszenzdetektors UPK 3100©. Quelle: Handbuch UPK 3100
- Abb. 3.5. Integration der exhalativen NO-Messung.
- Abb. 3.6. Schematische Darstellung der Integration der  $NO_x$ -Analytik.
- Abb. 3.7. Original Eichkurve bei Eichung mit 2,5; 5; 10; 25; 50; 100  $\mu M$  Nitratlösung sowie mit der Hydroxyethylstärkehaltigen Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung (KHHB).
- Abb. 3.8. Regressionsgerade durch die Kalibrationsmesspunkte nach Abzug der ermittelten  $NO_x$ -Konzentrationen für die Perfusatlösung und des zur Verdünnung benötigten destillierten Wassers.
- Abb. 3.9. Versuchsabbau zur Validitätsprüfung der entwickelten Fehlerkorrektur.
- Abb. 3.10. Graphischer Vergleich zwischen gemessenen, korrigierten und errechneten Messdaten anhand eines Kontrollversuchs.
- Abb. 3.11. Schematisierter Versuchsverlauf.
- Abb. 4.1. Exhalative NO-Emission während der Versuchsreihen mit 180minütiger Ischämie sowie der entsprechenden Kontrollversuche.
- Abb. 4.2. Kurvenverläufe der expiratorischen NO-Konzentrationen während der Versuchsreihen mit 210 Minuten Ischämie sowie der entsprechenden Kontrollversuche.
- Abb. 4.3. Die intravaskuläre  $NO_x$ -Produktion vor Beginn und nach einer 180-minütigen Ischämieperiode zeigt die Auswirkungen einer normoxischen

- bzw. anoxischen Beatmung im Intervall sowie den Einfluss der L-NMMA Applikation auf die intravasale NO-Liberation.
- Abb. 4.4. Einfluss von oxischer bzw. anoxischer Beatmung, L-NMMA- und SOD-Applikation auf die intravasale NO<sub>x</sub>-Produktion vor und nach einer Ischämieperiode von 210 Minuten Dauer.
- Abb. 4.5. Vergleich der intravasalen NO<sub>x</sub>-Akkumulation im Zeitintervall der 180-minütigen Ischämie.
- Abb. 4.6. Einfluss der Anwesenheit von Sauerstoff, LNMMA und SOD auf die intravasale NO<sub>x</sub>-Produktion während einer Ischämieperiode von 210 Minuten Dauer.
- Abb. 4.7. Prä- und postischämischer PA-Druckverlauf bei Versuchen mit 180-minütiger Ischämiezeit.
- Abb. 4.8. PA-Druckverlauf der einzelnen Versuchsreihen vor und nach 210 Minuten Ischämie.
- Abb. 4.9. Ergebnisse der prä- und postischämischen K<sub>fc</sub>-Messung in den 180-minütigen Ischämie-Versuchsreihen.
- Abb. 4.10. Vergleich der Gewichtsretention vor und nach 180-minütiger Ischämie.
- Abb. 4.11. Vergleich der prä- und postischämischen K<sub>fc</sub>-Werte der Versuchsreihen mit einer 210-minütigen Ischämie.
- Abb. 4.12. Prä- und postischämische Gewichtsretentionen nach 210 Minuten Ischämie im Vergleich.
- Abb. 4.13. Messwerte der exhalativen NO-Konzentration vor, während und nach einer 90-minütigen anoxisch ventilierten Ischämieperiode mit kollabierten Gefäßen.
- Abb. 4.14. Wiedereinsetzen der intravasalen NO<sub>x</sub>-Produktion nach einer 90-minütigen anoxischen Ischämie bei fehlender vasaler Distension.
- Abb. 4.15. PA-Druckverlauf bei Versuchen mit 90-minütiger anoxischer Ischämie.
- Abb. 4.16. Messergebnisse des prä- und postischämischen kapillären Filtrationskoeffizienten nach einer 90minütigen Ischämie ohne erhaltenen positiven intravasalen Druck.
- Abb. 5.1. Chemische Reaktionen des Stickstoffmonoxids.

Abbildungen ohne Quelleangabe stellen eigene Entwürfe dar.

**Literaturverzeichnis:**

- 1 Riedle, U.N., H.E. Schäfer. Allgemeine und spezielle Pathologie. *Thieme-Verlag, Stuttgart: 21-24, 210-213, 426-433, 436-447, 1995*
- 2 Reinke, P. Referentin des Virchow-Klinikums, Med. Fakultät der Humboldt-Universität Berlin auf dem 8. Walter-Brendel-Kolleg für Transplantationsmedizin, Wildbad-Kreuth, 11.-17.03.2001
- 3 Marburger Bund. Zwischen Bangen und Hoffen. Ärztliche Nachrichten, Nr. 2, 3, Ausgabe 16.02.2001
- 4 Zenati, M., S.M. Pham, R.J. Keenan, B.P. Griffith. Extracorporeal membrane oxygenation for lung transplant recipients with primary severe donor lung dysfunction. *Transpl. Int.* 9 (3): 227-230, 1996
- 5 Christie, J.D., J.E. Bavaria, H.I. Palevsky, L. Litzky, N.P. Blumenthal, L.R. Kaiser, R.M. Kotloff. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 114: 51-60, 1998
- 6 Pinsky, D.J. The vascular biology of heart and lung preservation for transplantation. *Thromb. Haemost.* 74 (1): 58-65, 1995
- 7 Palmer, R.M.J., D.D. Rees, D.S. Ashton, S. Moncada. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1251-1256, 1988
- 8 Sakuma, I., D.J. Stuehr, S.S. Gross, C. Nathan, R. Levi. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8664-8667, 1988
- 9 Grimminger, F., M. Thomas, R. Obernitz, D. Walmrath, S. Bhakdi, W. Seeger. Inflammatory lipid mediator generation elicited by viable hemolysin-forming *Escherichia coli* in lung vasculature. *J. Exp. Med.* 172: 1115 – 1125, 1990
- 10 Grimminger, F., R. Spriesterbach, N. Weissmann, D. Walmrath, W. Seeger. Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 78 (4): 1509-1515, 1995
- 11 Schütte H., K. Mayer, T. Gessler, M. Rühl, J. Schlaudraff, H. Burger, W. Seeger, F. Grimminger. Nitric oxide biosynthesis in an exotoxin-induced septic lung model - role of cNOS and impact on pulmonary hemodynamics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 498-504, 1998

- 12 Gilroy, R.J. Jr., M.J. Bhatte, N.E. Wickersham, N.A. Pou, J.E. Loyd, K.A. Overholser. Postischemic hypoperfusion during unilateral lung reperfusion in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 276 - 282, 1993
- 13 Allison, R.C., J. Kyle, W.K. Adkins, V.R. Prasad, J.M. McCord, A.E. Taylor. Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. *J. Appl. Physiol.* 69: 597 - 603, 1990
- 14 Bishop, M.J., W. Lamm, S.M. Guidotti, R.K. Albert. Pulmonary artery occlusion is sufficient to increase pulmonary vascular permeability in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 78: 2245 - 2252, 1992
- 15 Rose, F., B. Guthmann, T. Tenenbaum, L. Fink, H.A. Ghogfrani, N. Weismann, J. Haenze, W. Kummer, W. Seeger, F. Grimminger. Apical but not basolateral endotoxin preincubation protects alveolar epithelial cells against hydrogen peroxide-induced loss of barrier function: role of nitric oxide synthesis. *Journal of Immunology* 169: 1474-1481, 2002
- 16 Hermle, G., H. Schütte, D. Walmrath, W. Seeger, F. Grimminger. Ventilation-perfusion mismatch after lung ischaemia-reperfusion. Protective effect of nitric oxid. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160: 1179-1187, 1999
- 17 Seibert, A.F., J. Haynes, A. Taylor, Ischemia-reperfusion injury in the isolated rat lung. Role of flow and endogenous leukocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 270 - 275, 1993
- 18 Moore, T.M., P. Khimenko, W.K. Adkins, M. Miyasaka, A.E. Taylor, Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion-induced injury in the isolated rat lung. *J. Appl. Physiol.* 78: 2245 - 2252, 1995
- 19 Hammond, B., H.A. Kontos, M.L. Hess. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63 (3): 173-187, 1985
- 20 Bulkley, G.B.. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer Suppl.* 8: 66-73, 1987
- 21 Grisham, M.B., D.N. Granger. Metabolic sources of reaktive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin. Chest. Med.* 10 (1): 71-81, 1989
- 22 Bostek, C.C.. Oxygen toxicity: an introduction. *AANA. J.* 57 (3): 231-237, 1989

- 23 Antonaci, S., C. Tortorella. The role of free oxygen radicals in myocardial damage from ischemia/reperfusion, in chronic obstructive bronchopneumopathy and aging. *Recenti. Prog. Med.* 83 (2): 105-112, 1992
- 24 Zhao, G., A.B. Al-Mehdi, A.B. Fisher. Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.* 273: 1112-1117, 1997
- 25 Al-Mehdi, A.B., G. Zhao, C. Dodia, K. Tozawa, K. Costa, V. Muzykantov, C. Ross, F. Blecha, M. Dinanuer, A.B. Fisher. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K<sup>+</sup>. *Circ.Res* 83: 730-737, 1998
- 26 Fujii, H., K. Ichimori, K. Hoshiai, H. Nakazawa. Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. *J. Biol. Chem.* 272: 32773-32778, 1997
- 27 Vásquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martásek, N. Hogg, B.S.S. Master, H. Karoui, P. Tordo, K.A. Pritchard. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 9220-9225, 1998
- 28 Chandel, N.S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C.E. Mathieu, M.C. Simon, P.T. Schumacker. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 11715-11720, 1998
- 29 Heffner, J.E., J.E. Repine. Pulmonary strategies of antioxidant defence. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 531-554, 1989
- 30 Rice, K.L., P.G. Duane, S.L. Archer, D.P. Gilboe, D.E. Niewoehner. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury causes Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent hydrolysis of phosphatidylcholine in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 263: 430-438, 1992
- 31 Crim, C., W.J. Longmore. Sublethal hydrogen peroxide inhibits alveolar type II cell surfactant phospholipid biosynthetic enzymes. *Am. J. Physiol.* 268: 129-135, 1995
- 32 Rhee, S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31: 53-59, 1999
- 33 Meehan W.J., J.P. Spencer, D.E. Rannels, D.R. Welch, E.T. Knobbe, G.K. Ostrander. Hydrogen peroxide induces oxidative DNA damage in rat type II pulmonary epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen* 33 : 273-278, 1999

- 34 Fantone, J.C., P.A. Ward. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte-dependent inflammatory reaction. *Am. J. Pathol.* 107: 397-418, 1992
- 35 Kim, K.J., D.J. Suh. Asymmetric effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on alveolar epithelial properties. *Am. J. Physiol.* 264: 308-315, 1993
- 36 Buerke, M., T. Murohara, A.M. Lefer. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 91: 393-402, 1995
- 37 von Dobschuetz, E., O. Bleiziffer, S. Pahernik, M. Dellian, T. Hoffmann, K. Messmer. Soluble complement receptor 1 preserves endothelial barrier function and microcirculation in postischemic pancreatitis in the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286(5): 791-796, 2004
- 38 Lehmann, T.G., T.A. Koepfel, S. Munch, M. Hegger, M. Kirschfink, E. Klar, S. Post. Impact of inhibition of complement by sCR1 on hepatic microcirculation after warm ischemia. *Microvasc. Res.* 62(3): 284-292, 2001
- 39 Buddecke, E. Grundriss der Biochemie. 8. Auflage, New York, de Gruyter, 384-389, 1989
- 40 Chopra, J., R.O. Webster. PGE<sub>1</sub> inhibits neutrophil adherence and neutrophil-mediated injury to cultured endothelial cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 915 – 920, 1988
- 41 Mathe, A.A., P. Hedqvist, K. Strandberg, C.A. Leslie. Aspects of prostaglandin function in the lung. *N. Eng. J. Med.* 296: 850-855, 910-914, 1977
- 42 Moncada, S., J.R. Vane. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 30: 293-331, 1979
- 43 Menconi, M., G. Hahn, P. Polgar. Prostaglandin synthesis by cells comprising the calf pulmonary artery. *J. Cell. Physiol.* 120(2): 163-168, 1984
- 44 Smith, W.L. Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* 268: 181-91, 1992
- 45 Hamberg, M., J. Svensson, B. Samuelsson. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2994-2998, 1975
- 46 Bhagwat, S.S., P.R. Hamann, W.C. Still, S. Bunting, F.A. Fitzpatrick. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A<sub>2</sub>. *Nature* 315: 511-513, 1985



- 47 Halushka, P.V., D.E. Mais, P.R. Mayeux, T.A. Morinelli. Thromboxane, prostaglandin and leucotriene receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 213-239, 1989
- 48 Goodman, L., A.G. Gilman. *Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie. 9. Auflage, London, McGraw Hill: 609-632, 1999*
- 49 Boie, Y., T.H. Rushmore, A. Darmon-Goodwin, R. Grygorczyk, D.M. Slipetz, K.M. Metters, M. Abramovitz. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J. Biol. Chem.* 269 (16): 12173-12178, 1994
- 50 Berowitz, B.A., B. Zabko-Potapovich, R. Valocik, J.G. Gleason. Effects of the leukotrienes on the vasculature and blood pressure of different species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229: 105-112, 1984
- 51 Samuelsson, B., S.E. Dahlen, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer, C.N. Serhan. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science* 237: 1171-1176, 1987
- 52 Dobbs, L.G. Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* 258: 134-147, 1990
- 53 Mason, R.J., J.M. Shannon. Alveolar type II cells. *The lung: Scientific foundations. Lippincott-Raven, Philadelphia: 543-555, 1997*
- 54 Luce, J.M. Acute injury and the acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care. Med.* 26: 369-376, 1998
- 55 Kim S.K. Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 641-649, 1995
- 56 Yeaman, C., K.K. Grindstaff, W.J. Nelson. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol. Rev.* 79: 73-98, 1999
- 57 Bartels, H., H.J. Oestern, Voss-Wembter. Communicating-occluding junction complexes in the alveolar epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121: 1017-1024, 1980
- 58 Madara, J.L. Tight junctions dynamic: Is paracellular transport regulated? *Cell.* 53: 497-498, 1988
- 59 Anderson, J.M., M.S. Balda, A.S. Fanning. The structure and regulation of tight junctions. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 772-778, 1993
- 60 Bhat, M., D. Toledo-Velasquez, L. Wand, C.J. Malanga, J.K. Ma, Y. Rojana-sakul. Regulation of tight junction permeability by calcium and cell cytoskeleton in rabbit tracheal epithelium. *Pharm. Res.* 10: 991-997, 1993

- 61 Anderson, J.M., C.M. Van Italie. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* 269: 467-475, 1995
- 62 Balda, M.S., K. Matter. Tight junctions. *J. Cell Sci.* 111: 541-547, 1998
- 63 Khimenko, P.L., J.W. Barnard, T.M. Moore, P.S. Wilson, S.T. Ballard, A.E. Taylor. Vascular permeability and epithelial transport effects on lung edema formation in ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.* 77: 1116-1121, 1994
- 64 Ware, L.B., J.A. Golden, W.E. Finkbeiner, M.A. Matthay. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 159: 980-988, 1999
- 65 Sakuma, T., C. Tsukano, M. Ishigaki, Y. Nambu, K. Osanai, H. Toga, K. Takahashi, N. Ohya, T. Kurihara, M. Nishio, M.A. Matthay. Lung deflation impairs alveolar epithelial fluid transport in ischemic rabbit and rat lungs. *Transplantation* 69(9): 1785-1793, 2000
- 66 Sakuma, T., M. Hida, Y. Nambu, K. Osanai, H. Toga, K. Takahashi, N. Ohya, M. Inoue, Y. Watanabe. Effects of hypoxia on alveolar fluid transport capacity in rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 91(4): 1766-1774, 2001
- 67 Pittet, J.F., L.N. Lu, D.G. Morris, K. Modelska, W.J. Welch, H.V. Carey, J. Roux, M.A. Matthay. Reactive nitrogen species inhibit alveolar epithelial fluid transport after hemorrhagic shock in rats. *J. Immunol.* 166(10): 6301-6310, 2001
- 68 Karow, T., R. Lang. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *F. Hansen, Bergisch-Gladbach: 126-134, 517-519, 1997*
- 69 Ignarro, L.J., G.M. Buga; Wood, K.S., R.E. Byrns, G. Chaudhuri. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9265-9269, 1987
- 70 Palmer, R.M.J., A.G. Ferrige, S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
- 71 Moncada, S., R.M. Palmer, E.A. Higgs. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142, 1991
- 72 Johnston, B., J.P. Gaboury, M. Suematsu, P. Kubes. Nitric oxide inhibits microvascular protein leakage induced by leucocyte adhesion-independent and adhesion-dependent inflammatory mediators. *Microcirculation* 6: 153-162, 1999

- 73 Furlong, B., A.M. Henderson, M.J. Lewis, J.A. Smith. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.* 90: 687-692, 1987
- 74 Garthwaite, J., S.L. Charles, R. Chess-Williams. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388, 1988
- 75 Marin, J., C.F. Sanchez-Ferrer. Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular response. *Gen. Pharmacol.* 21(5): 575-587, 1990
- 76 Johns, R.A. Endothelium derived relaxing factors: Basic review and clinical implications. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 5(1): 69-79, 1991
- 77 Altura, B.M., N. Chand. Bradykinin-induced relaxation of renal and pulmonary arteries is dependent upon intact endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 74(1): 10-11, 1981
- 78 Whittle, B.J., J. Lopez-Belmonte, D.D. Rees. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholin, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br. J. Pharmacol.* 98(2): 646-652, 1989
- 79 Karow, T., R. Lang-Roth. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *F. Hansen, Bergisch-Gladbach: 182-185, 2004*
- 80 Schilling, W.P., A.K. Ritchie, L.T. Navarro, S.G. Eskin. Bradykinin-stimulated calcium influx in cultured bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 255 (2): 219-27, 1988
- 81 Busse, R., U. Pohl, A. Luckhoff. Mechanisms controlling the production of endothelial autacoids. *Z. Kardiol.* 78 (6): 64-69, 1989
- 82 Evans, H.G., J.A. Smith, M.J. Lewis. Release of endothelium-derived relaxing factor is inhibited by 8-bromo-cyclic guanosine monophosphat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12(6): 672-677, 1988
- 83 Buga, G.M., J.M. Griscavage, N.E. Rogers, L.J. Ignarro. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ. Res.* 73(5): 808-812, 1993
- 84 Wilson, P.S., W.J. Thompson, T.M. Moore, P.L. Khimenko, A.E. Taylor. Vasoconstriction increases pulmonary nitric oxide synthesis and circulating cyclic GMP. *J. Surg. Res.* 70(1): 75-83, 1997

- 85 Grove, P., S. Kurz, H. Just, H. Drexler. Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. *Circulation*. 92: 3424-3430, 1995
- 86 Hellige, G., G. Spieckermann. Informationen zum Thema NO: In: Herz-Kreislauf Transparent, Hoechst Marion Roussel. *Hoffmann GmbH, Berlin*, 1998
- 87 Yen, M.H. J.H. Yang, J.R. Sheu, Y.M. Lee, Y.A. Ding. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilatation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 57(24): 2205-2213, 1995
- 88 Cai, Z., J. Xin, D.M. Pollock, J.S. Pollock. Shear stress-mediated NO-production in inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 279(2): 270-274, 2000
- 89 Krebs, H.A., H. Henseleit. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem*. 201, 33-66, 1932
- 90 Küttler, T.. Pharmakologie und Toxikologie, Gustav Fischer Verlag, *Stuttgart*, 111-113, 1996
- 91 Zapol, W.M., S. Rimar, N. Gillis, M. Marletta, C.H. Bosken. Nitric oxide and the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 149: 1375-1380, 1984
- 92 Seeger, W., D. Walmrath, M. Menger, H. Neuhofer. Increased lung vascular permeability after arachnidonic acid and hydrostatic challenge, *J. Appl. Physiol*. Vol. 61: 1781-1789, 1986
- 93 McDermott, J.R. Studies on the catabolism of NG-methylarginine, N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine and N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethylarginine in rabbit. *Biochem. J*. 154: 179-184, 1976
- 94 Valance, P., A. Leone, A. Calver, J. Collier, S. Moncada. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 20 (12): 60-62, 1992
- 95 Southan, G.J., B. Zingarelli, M. O'Connor, A.L. Salzman, C. Szabo. Spontaneous rearrangement of aminoalkylisothioureas into mercapto-alkylguanidines, a novel class of nitric oxide synthase inhibitors with selectivity towards the inducible isoform. *Br. J. Pharmacol*. 117: 619-632, 1996
- 96 Chinellato, A., G. Foldi, L. Caparrotta, E. Ragazzi. Pharmacological characterization of endothelial cell nitric oxide synthase inhibitors in isolated rabbit aorta. *Life Sci*. 62(6): 479-490, 1998

- 97 Pinsky, D.J., Y. Naka, N.C. Chowdhury, H. Liao, M.C. Oz, R.E. Michler, E. Kubaszewski, T. Malinski, D.M. Stern. The nitric oxide/cyclic GMP pathway in organ transplantation: critical role in successful lung preservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12086-12090, 1994
- 98 Barbotin-Larrieu, J., M. Mazmanian, B. Baudet, H. Detruit, A. Chapelier, J.M. Libert, P. Darteville, P. Hérve. Prevention of ischemia-reperfusion lung injury by inhaled nitric oxide in neonatal piglets. *J Appl. Physiol.* 80: 782-788, 1996
- 99 Chetham, P.M., W.D. Sefton, J.P. Bridges, T. Stevens, I.F. McMurtry. Inhaled nitric oxide pretreatment but not posttreatment attenuates ischemia-reperfusion-induced pulmonary microvascular leak. *Anesthesiology* 86: 895-902, 1997
- 100 Murakami, S., E.A. Bacha, G.M. Mazmanian, H. Déruit, A. Chapelier, P. Darteville, P. Hervé. Effects of various timings and concentrations of inhaled nitric oxide in lung ischemia-reperfusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 454-458, 1997
- 101 Poss, W.B., O.D. Timmons, I.S. Farrukh, J.H. Hoidal, J.R. Michael. Inhaled nitric oxide prevents the increase in pulmonary vascular permeability caused by hydrogen peroxide. *J. Appl. Physiol.* 79: 886-891, 1995
- 102 Guidot, D.M., B.M. Hybertson, R.G. Kitlowski, J.E. Repine. Inhaled NO prevents IL-1-induced neutrophil accumulation and associated acute edema in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.* 271: 225-229, 1996
- 103 Seeger, W., D. Walmrath, F. Grimminger, S. Rosseau, H. Schütte, H.J. Krämer, L. Ermert, L. Kiss. Acute respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Meth. Enzy. Vol.* 233: 549-584, 1994
- 104 Chang, S.W., N.F. Voelkel. Isolated perfused rat lung in arachidonate studies. *Meth. Enzy. Vol.* 187: 599-610, 1990
- 105 Sato, H., Z.Q. Zhao, J.E. Jordan, J.C. Todd, R.D. Riley, C.S. Taft, J.W. Hammon Jr., P. Li, X. Ma, J. Vinten-Johansen. Basal nitric oxide expresses endogenous cardioprotection during reperfusion by inhibition of neutrophil-mediated damage after surgical revascularization. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 113: 399-409, 1997
- 106 Williams, M.W., C.S. Taft, S. Ramnauth, Z.Q. Zhao, J. Vinten-Johansen. Endogenous nitric oxide (NO) protects against ischaemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc. Res.* 30: 79-86, 1995

- 107 Masini, E., D. Salvemini, J.F. Ndisang, P. Gai, L. Berni, M. Moncini, S. Bianchi, P.F. Mannaioni. Cardioprotective activity of endogenous and exogenous nitric oxide on ischaemia reperfusion injury in isolated guinea pig hearts. *Inflamm. Res.* 48: 561-568, 1999
- 108 Cottart, C.H., L. Do, M.C. Blanc, M. Vaubourdolle, G. Descamps, D. Durand, F.X. Galen, J.P. Clot. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 29: 809-813, 1999
- 109 Iwata, F., T. Joh, Y. Yokoyama, M. Itoh. Role of endogenous nitric oxide in ischaemia-reperfusion injury of rat gastric mucosa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13 :: 997-1001, 1998
- 110 Kubes, P., D.N. Granger. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am. J. Physiol.* 262: 611-615, 1992
- 111 Lu ,Y.T., S.F. Liu, J.A. Mitchell, A.B. Malik, P.G. Hellewell, T.W. Evans. The role of endogenous nitric oxide in modulating ischemia-reperfusion injury in the isolated, blood-perfused rat lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 273-279, 1998
- 112 Flögel, U., U.K. Decking, A. Gödecke, J. Schrader. Contribution of NO to ischemia-reperfusion injury in the saline-perfused heart: a study in endothelial NO synthase knockout mice. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31: 827-836, 1999
- 113 Yu, L., P.E. Gengrao, M. Niederberger, T.J. Burke, R.W. Schrier. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1691-1695, 1994
- 114 Phan, L.H., M.J. Hickey, Z.B. Niazi, A.G. Stewart. Nitric oxide synthase inhibitor, nitro-iminoethyl-L-ornithine, reduces ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle. *Microsurgery* 15: 703-707, 1994
- 115 Nishikawa, T., J.R. Kirsch, R.C. Koehler, M. Miyabe, R.J. Traystman. Nitric oxide synthase inhibition reduces caudate injury following transient focal ischemia in cats. *Stroke* 25: 877-885, 1994
- 116 Naka, Y., D.K. Roy, A.J. Smerling, R.E. Michler, C.R. Smith, D.M. Stern, M.C. Oz, D.J. Pinsky. Inhaled nitric oxide fails to confer the pulmonary protection provided by distal stimulation of the nitric oxide pathway at the level of cyclic guanosine monophosphate. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 110: 1434-1441, 1995

- 117 Lopez-Neblina, F., A.J. Paez, A.H. Toledo, L.H. Toledo-Pereyra. Role of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the rat kidney. *Circ. Shock* 44: 91-95, 1994
- 118 Hamvas, A., C.K. Park, R. Palazzo, M. Liptay, J. Cooper, D.P. Schuster. Modifying pulmonary ischemia-reperfusion injury by altering ventilatory strategies during ischemia. *J. Appl. Physiol.* 73: 2112-2119, 1992
- 119 Schütte, H., G. Hermle, W. Seeger, F. Grimminger. Vascular Distension and Continued Ventilation Are Protective in Lung Ischemia/Reperfusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 171-177, 1998
- 120 Becker, P.M., W. Buchanan, J.T. Sylvester. Protective effects of intravascular pressure and nitric oxide in ischemic lung injury. *J. Appl. Physiol.* 84: 803-808, 1998
- 121 Walmrath, D., H.A. Ghofrani, S. Rosseau, H. Schütte, A. Cramer, W. Kaddus, F. Grimminger, S. Bhakdi, W. Seeger. Endotoxin "priming" potentiates lung vascular abnormalities in response to Escherichia coli hemolysin: an example of synergism between endo- and exotoxin. *J. Ex. Med.* 180: 1437-1443, 1994
- 122 Weissmann, N., F. Grimminger, D. Walmrath, W. Seeger. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir. Physiol.* 100: 159-169, 1995
- 123 Crystal, R.G., J.B. West. The lung. Raven Press, New York, 1991
- 124 Dawson, C.A., J.H. Linehan and D.A. Rickaby. Pulmonary microcirculatory hemodynamics. *Ann. NY. Acad. Sci.* 384: 90-106, 1982
- 125 Townsley, M.I., R.J. Korthuis, B. Rippe, J.C. Parker and A.E. Taylor. Validation of double vascular occlusion method for Pc in lung and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 61: 127-132, 1986
- 126 Hakim, T.S.. Identification of constriction in large versus small vessels using the arterial-venous and the double-occlusion techniques in isolated canine lungs. *Respiration* 54: 61-69, 1988
- 127 Linehan, J.H., C.A. Dawson, T.A. Bronikowski, D.A. Rickaby. Sites of vasoactivity in the pulmonary circulation evaluated using rapid occlusion methods. *Microvascular Mechanics, Springer Verlag, New York: 118-133, 1989*
- 128 Cope, D.K., F. Grimbert, J.M. Downey, A.E. Taylor. Pulmonary capillary pressure: A review. *Crit. Care Med.* 20(7): 1043-1056, 1992
- 129 Hakim, T.S. and S. Kelly. Occlusion pressures vs. Micropipette in the pulmonary circulation. *J. Appl. Physiol.* 67: 1277-1285, 1989

- 130 Barman, S.A., E. Senteno, S. Smith, A.E. Taylor. Acetylcholine's effect on vascular resistance and compliance in the pulmonary circulation. *J. Appl. Physiol.* 67: 1495-1503, 1989
- 131 Audi, S.H., C.A. Dawson, D.A. Rickaby, J.H. Linehan. Localization of the sites of pulmonary vasomotion by use of arterial and venous occlusion. *J. Appl. Physiol.* 70(5): 2126-2136, 1991
- 132 Wangensteen, O.D., E. Lysaker, P. Savaryn. Pulmonary capillary filtration and reflection coefficients in the adult rabbit. *Microvasc. Res.* 14: 81-97, 1977
- 133 Staub, N.C., R.W. Hyde, E. Crandall. NHLBI workshop summary. Workshop on techniques to evaluate lung alveolar-microvascular injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 1071-1077, 1990
- 134 Nunn J.F.. Applied Respiratory Physiology. *Butterworth-Heinemann, Oxford: 148-151. 1993*
- 135 Schmidt, R.F., G. Thews. Physiologie des Menschen. 24. Aufl., *Springer Verlag, Berlin: 782, 1990*
- 136 Silbernagel, S., F. Lang. Taschenatlas der Pathophysiologie. *Thieme-Verlag, Stuttgart: 234-235, 1998*
- 137 Clyne, A.A., B.A. Trush, R.P. Wayne. Kinetics of the chemiluminescent reaction between nitric oxide and ozone. *Trans. Farad. Soc.* 60: 359-370, 1964
- 138 Clough, P.N., B.A. Trush. Mechanism of the chemiluminescent reaction between nitric oxide and ozone. *Trans. Farad. Soc.* 63: 915-925, 1967
- 139 Hui, K.K., T.A. Cool. Experiments concerning the laser-enhanced reaction between vibrationally excited O<sub>3</sub> and NO. *J. Chem. Phys.* 68(3): 1022-1037, 1978
- 140 Fontijn, A., A.J. Sabadell, R.J. Ronco. Homogenous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. *Anal. Chem.* 42(6): 575-579, 1970
- 141 Braman, R.S., S.A. Hendrix. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium(III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal. Chem.* 61: 2715-2718, 1989
- 142 Spriestersbach, R., F. Grimminger, N. Weissmann, D. Walmrath, W. Seeger. Online measurement of nitric oxide generation in buffer-perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 78 (4): 1502-1508, 1995



- 143 Gessler, T., Kontinuierliche Messung von Stickstoffmonoxid sowie dessen Oxidationsprodukten Nitrit, Nitrat und Peroxynitrit in zirkulierenden Flüssigkeiten mittels Amperometrie und Chemilumineszenz. Physikalische Diplomarbeit am 1. *Physikalischem Institut und der Klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ der Justus-Liebig-Universität, Gießen*, 1996
- 144 Radi, R., T.P. Cosgrove, J.S. Beckmann, B.A. Freeman. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem. J.* 290: 51-57, 1993
- 145 Beckmann, J.S., T.W. Beckmann, J. Chen, P.A. Marshall, B.A. Freeman. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620-1624, 1990
- 146 Matheis, G., M.P. Sherman, G.D. Buckberg, D.M. Haybron, H.H. Young, L. J. Ignarro. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am. J Physiol.* 262: 616-620, 1992
- 147 Beckman, J.S., W.H. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J Physiol.* 271: 1424-1437, 1996
- 148 McCord, J.M.. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312: 159-163, 1985
- 149 Yasmin, W., K.D. Strynadka, R. Schulz. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc. Res.* 33: 422-432, 1997
- 150 Huang, Y.C.T., P.W. Fisher, E. Nozik-Grayck, C.A. Piantadosi. Hypoxia compared with normoxia alters the effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion lung injury. *Am. J Physiol.* 273: 504-512, 1997
- 151 Zhao, G., A.B. Al-Mehdi, A.B. Fisher. Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.* 273: 1112-1117, 1997
- 152 Eppinger, M.J., P.A. Ward, M.L. Jones, S.F. Bolling, G.M. Deeb. Disparate effects of nitric oxide on lung ischemia reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* 60: 1169-1176, 1995
- 153 Schütte, H., M. Witzernath, K. Mayer, S. Rosseau, W. Seeger, F. Grimminger. Short-term „preconditioning“ with inhaled nitric oxide protects rabbit lungs against ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 72(8): 1363-1370, 2001

- 
- 154 Voswinkel, R., Untersuchungen von Sensor- und Signaltransduktionsmechanismen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion an der isolierten, artifiziell ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge. *VVB Laufersweiler Verlag, Wettenberg, 2000*
- 155 Bachetti, T., E. Pasini, H. Suzuki, R. Ferrari. Species-specific modulation of the nitric oxide pathway after acute experimentally induced endotoxemia. *Crit. Care Med.* 31(5): 1509-1514, 2003
- 156 Gerlach H., R. Rossaint, D. Pappert, K.J. Falke. Time-course and dose-response of nitric oxide inhalation for systemic oxygenation and pulmonary hypertension in patients with adult respiratory distress syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* 23(8): 499-502, 1993
- 157 Schütte, H., M. Witzenrath, K. Mayer, N. Weissmann, A. Schell, S. Rosseau, W. Seeger, F. Grimminger. The PDE inhibitor zaprinast enhances NO-mediated protection against vascular leakage in reperfused lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279(3): 496-502, 2000

**Publikationsverzeichnis:****Originalarbeit**

- Schütte H., K. Mayer, **H. Burger**, M. Witzernath, T. Gessler, W. Seeger, F. Grimminger. Endogenous nitric oxide synthesis and vascular leakage in ischemic-reperfused rabbit lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 412-418, 2001

**Abstracts und veröffentlichte Vorträge:**

- Mayer K., H. Schütte, T. Gessler, M. Rühl, J. Schlaudraff, **H. Burger**, S. Bakhdi, F. Grimminger, W. Seeger. Einfluß von Phosphodiesterase-Inhibitoren auf Vaso-regulation und NO-Freisetzung in einem Modell der septischen Lunge. *Pneumologie* 51 (194): 195; 38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, 1997
- Schütte H., K. Mayer, T. Gessler, M. Rühl, J. Schlaudraff, **H. Burger**, W. Seeger, F. Grimminger. Nitric oxide biosynthesis in an exotoxin-induced septic lung model - role of cNOS and impact on pulmonary hemodynamics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 498-504, 1998

**Lebenslauf**

**Geburstag / -ort** 06.03.1970 / Berlin

**Eltern** Eva Burger, geb. Coesfeld  
Hans-Georg Burger

**Familienstand** verheiratet mit Ilonka Burger, geb. Rolitschek,  
Dipl. Ing. für Umwelt- und Hygienetechnik,  
Tochter Eileen Burger

**Schulausbildung**

**07/76 - 07/80** Grundschule Hüttenberg / Rechtenbach

**08/80 - 06/86** Gesamtschule Brüder-Grimm-Schule in Gießen Klein-Linden

**08/86 - 05/89** Oberstufe Justus-Liebig-Schule in Gießen, Abschluss Abitur

**Wehrdienst**

**06/89 - 06/91** Zeitsoldat (SAZ 2) als Reserveoffizieranwärter (ROA),  
z.Zt. Stabsarzt d.R. Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz

**Akademische Ausbildung**

**10/91 – 05/00** Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

**03/95** Physikum

**04/98** 1. Staatsexamen

**04/99** 2. Staatsexamen

**05/00** 3. Staatsexamen

**Dissertation: experimenteller Teil**

**09/96 – 02/98** Experimentelle Untersuchungen im Sonderforschungsbereich  
547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ am Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Werner Seeger

**10/97 – 02/98**      Anstellung als Wissenschaftliche Hilfskraft im Sonderforschungsbereich „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ am Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Beruflicher Werdegang**

**07/00 – 12/01**      Anstellung als Arzt im Praktikum in der Thorax- und Kardiovaskularchirurgie der Kerckhoff Klinik GmbH in Bad Nauheim unter der Leitung von Prof. Dr. med. W.-P. Klövekorn

**Seit 01/02**          Assistenzarzt in der Thorax- und Kardiovaskularchirurgie zur herzchirurgischen Facharztausbildung unter der Leitung von Prof. Dr. med. W.-P. Klövekorn, Kerckhoff Klinik GmbH in Bad Nauheim

## **Erklärung zur Dissertationsarbeit**

Hiermit erkläre ich:

Die vorgelegte Dissertation habe ich selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in dieser Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten.

Gießen 2007, Heiko Burger

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit begleitet haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, im Rahmen seiner Forschungsgruppe wissenschaftlich tätig zu werden. Seine fachliche und insbesondere menschliche Kompetenz werden mir Vorbild sein. Gleiches gilt für Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Friedrich Grimminger, der mit Anregungen, Hinweisen und Ideen den Fortgang dieser Arbeit stets zu fördern vermochte.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls ausdrücklich bei Herrn Dr. med. Hartwig Schütte für sein Engagement und seine Hilfestellungen im wissenschaftlichen und technischen Bereich. Ohne die fortwährende wissenschaftliche Diskussion, seine Hinweise und Ideen hätte diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht entstehen können. Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Dr. med. Konstantin Mayer, der mir insbesondere bei der Programmerstellung der computergestützten Fehlerkorrektur zur NO<sub>x</sub>-Analyse tatkräftig zur Seite stand.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Tobias Gessler für seine freundschaftliche und herzliche Unterstützung, sein Engagement und seine entgegenkommende Art sowie der Hilfe bei wissenschaftlichen und technischen Fragen bedanken.

Weiterhin schließe ich die Mitarbeiter des Sonderforschungsbereichs „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ der Justus-Liebig Universität Giessen, insbesondere Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weissmann, Herrn Prof. Dr. med. Ardeschir Ghofrani, Frau Karin Quanz, Frau Carmen Homberger und Herrn Marc Ziemann sowie Herrn Dr. med. Tibor Ziegelhöffer vom Max Planck Institut in Bad Nauheim in meine Danksagung ein. Die zuvorkommende Unterstützung und die technischen Hilfestellungen waren ein wichtiger Beitrag zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Ehefrau Ilonka und meiner Tochter Eileen für Ihr Verständnis und Ihre immerwährenden Aufmunterungen bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5334-6



9 783835 195334 5

